

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
BIOMEDITSIINI OSAKOND  
MOLEKULAARPATOLOOGIA UURIMISRÜHM

**dCas9-KRAB liitvalgu mõju AIRE partnervalkude ekspressioonile**

Magistritöö

30 EAP

Hanna Sein

Juhendajad Teadur Mario Saare

Professor Pärt Peterson

TARTU 2019

## INFOLEHT

### **dCas9-KRAB liitvalgu mõju AIRE partnervalkude ekspressioonile**

Autoimmuunhaiguste tekke vältimiseks toimub tüümuse säsi rakkudes autoantigeenide presenteerimine arenevatele T-rakkudele, mille käigus elimineeritakse autoreaktiivsed T-rakud enne perifeersetesse kudedesse migreerumist. Autoantigeenide avaldumise eest tüümuses vastutab suures osas autoimmuunsuse regulaator AIRE. Oma funktsiooni saavutamiseks interakteerub AIRE mitmete partnervalkudega, millest paljusid on AIRE kontekstis vähe uuritud. Selles töös kasutatakse CRISPR interferents meetodit, et uurida valiku AIRE interaktsioonipartnerite geeniekspressiooni vaigistamise mõju AIRE sihtmärkgeenide ekspressioonile. Kasutatud AIRE-HEK/Tet mudelsüsteemis jõutakse mitmete valkude geeniekspressiooni alla reguleerimiseni, kuid muutust AIRE sihtmärkgeenide ekspressioonis ei nähtud.

**Märksõnad:** immuuntolerantsus, autoimmuunsus, AIRE, APS1, CRISPR-Cas, CRISPRi

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **The impact of dCas9-KRAB fusion protein on the expression of AIRE's partner proteins**

In order to prevent the development of autoimmune diseases, thousands of autoantigens are presented to developing T cells in the thymic medulla. Autoreactive T cells are eliminated before migrating to the peripheral tissues. The autoimmune regulator AIRE is largely responsible for the expression of autoantigens in the thymus. To achieve its function, AIRE interacts with a number of partner proteins, many of which have been little studied in the context of AIRE. In this work, the CRISPR interference method is used to down regulate the gene expression of a selection of AIRE interaction partners to investigate its effect on the expression of AIRE target genes. In the model system used, the gene expression of several proteins is down regulated, but no change in the expression of AIRE target genes was observed.

**Keywords:** immune tolerance, autoimmunity, AIRE, APS1, CRISPR-Cas, CRISPRi

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Immuuntolerantsus.....	9
1.2 AIRE geen ja valk.....	10
1.3 AIRE partnervalgud .....	11
1.4 APS1 .....	11
1.5 CRISPR/Cas süsteemi bioloogiline mehhanism.....	12
1.6 CRISPR-Cas9 kasutamine molekulaarbioloogias.....	14
1.7 CRISPR-Cas süsteemi edasiarendused .....	16
1.8 CRISPR/Cas9 süsteemi head ja vead.....	17
1.9 Tetratsükliiniga reguleeritav geeniekspressiooni süsteem.....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjalid ja meetodika .....	19
2.2.1 Bakteritüvi ja rakuliinid .....	19
2.2.2 Söötmed.....	19
2.2.3 Kloneerimine .....	20
2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon.....	20
2.2.5 pX330-EGFP plasmidi kloneerimine .....	21
2.2.6 gRNA proovide disain.....	23
2.2.7 gRNA järjestuste kloneerimine vektorisse .....	23
2.2.8 Transfektsioon ja doksütsükliiniga indutseerimine.....	24
2.2.9 RNA puhastamine ja cDNA sünteesimine .....	24
2.2.10 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon .....	24
2.2.11 dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemine.....	25

2.2.12 gRNA-de vahendatud AIRE-partnervalkude <i>knockdown</i> dCas9-KRAB liitvalku ekspresseerivas rakuliinis .....	26
2.2.13 AIRE-partnervalkude <i>knockdown</i> transientselt ekspresseerunud dCas9-KRAB liitvalguga.....	27
2.2.14 Western blot totaalsest rakulüsaadist .....	27
2. 3 TULEMUSED. ARUTELU.....	28
2.3.1 pX330-EGFP plasmiid ja gRNA järjestuste klonimine .....	28
2.3.2 dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemine.....	29
2.3.3 gRNA-de vahendatud AIRE-partnervalkude <i>knockdown</i> dCas9-KRAB liitvalku ekspresseerivas HEK1.12 rakuliinis.....	31
2.3.4 AIRE-partnervalkude <i>knockdown</i> transientselt ekspresseerunud dCas9-KRAB liitvalguga.....	36
KOKKUVÕTE .....	42
SUMMARY .....	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
Tänu sõnad.....	54
LISAD .....	55
Lihtlitsents .....	62

## KASUTATUD LÜHENDID

AIRE- *autoimmune regulator*, autoimmuunsus regulaator

APECED- *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*, autoimmuunne polüendokriinne kandidoos ektodermaalne düstroofia

APS1- *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1*, autoimmuunne polüendokriinne sündroom 1

ATF7ip- *Activating transcription factor 7-interacting protein*, aktiveeriva transkriptsiooni faktoriga 7 interakteeruv valk

BRD4- *bromodomain containing protein 4*, bromodomeeni sisaldav valk 4

CARD- *Caspase recruitment domain*, kaspase värbav domeen

CARF- *CRISPR-associated Rossman fold*, CRISPR-assotsieerunud Rossmani volt

Cas- *CRISPR-associated*, CRISPR-iga assotsieerunud

CBP- *CREB-binding protein*, CREB-iga seonduv valk

CD- *cluster of differentiation*, diferentseerumise klaster

CREB- *cAMP-responsive element binding*, cAMP vastuselemendile seonduv

CRISPR- *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, klasterdunud regulaarsete vahetega lühikesed palindroomsed kordused

CRISPRa- CRISPR aktivatsioon

CRISPRi- CRISPR interferents

crRNA- CRISPR-RNA

Csn2- CRISPR-associated protein Csn2, CRISPR-assotsieerunud valk Csn2

cTEC- *cortical thymic epithelial cells*, kortikaalsed tüümuse epiteeli rakud

dCas9- *dead Cas9*, surnud Cas9

DNA-PK- *DNA-dependent protein kinase*- DNA-sõltuv proteiinkinaas

gRNA- *guide RNA*, juhtiv RNA

HDR- *homology directed repair*, homoloogia suunatud parandamine

HNH- histidiin, asparagiin, histidiin

HP1- *heterochromatin protein 1*, heterokromatiini valk 1

IL- interleukiin

KAP1- *KRAB-associated protein 1*, KRAB-assotsieerunud valk 1

KRAB- *Krüppel-associated box*

LMNB1- *Lamin B1*, lamiin B1

MBD1- *Methyl-CpG-binding domain protein 1*, metüleeritud CpG saartele seonduv valk 1

MHC- *major histocompatibility complex*, peamine koesobivuskompleks

mTEC- *medullary thymic epithelial cells*, medullarsed tüümuse epiteeli rakud

NHEJ- *nonhomologous end joining*, mittehomoloogne otste ühendamine

NLS- *nuclear localization signal*, tuuma lokalisatsiooni signaal

NuRD- *nucleosome remodeling deacetylase*, nukleosoomi remodelleeriv deatsetülaas

PAM- *protospacer adjacent motif*, eraldajaga külgnev motiiv

PARP1- *Poly[ADP-ribose]polymerase 1*, polü[ADP-riboos]polümeraas 1

PHD- *plant homeodomain*, PHD tsinsõrme tüüpi valgudomeen

pre-crRNA- pre-CRISPR-RNA

P-TEFb- *positive transcription elongation factor b*, positiivne transkriptsiooni elongatsiooni faktor b

RANBP2- *RAN binding protein 2*, RAN-seonduv valk 2

RNAi- RNA interferents

RuvBL1- *RuvB-like 1*, RuvB-sarnane 1

RuvBL2- *RuvB-like 2*, RuvB-sarnane 2

SAND- Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1

SETB1- *SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1*, SET domeeniga histooni lüsiini metüültransferaas 1

TCR- *T-cell receptor*, T-raku retseptor

TOP2A- *topoisomerase 2a*, topoisomeraas 2a

TOP2B- *topoisomerase 2b*, topoisomeraas 2b

TRA- *tissue-restricted antigen*

tracrRNA- *trans-activating crRNA*, transaktiveeriv crRNA

TSS- *transcription start site*, transkriptsiooni alguskoht

VP16- *viral protein 16*, viiruse valk 16

## SISSEJUHATUS

Immuunsüsteemi ülesandeks on võidelda organismi tunginud haigustekitajatega ning sealjuures mitte käivitada immuunreaktsioone kehaomaste molekulide vastu. Sellise seisundi, mida nimetatakse immuuntolerantsuseks, saavutamiseks toimub tüümuses T-rakkude küpsemine. Küpsemise käigus presenteeritakse arenevatele T-rakkudele tuhandeid kehaomaseid peptiide. Juhul, kui T-rakul tekib nende peptiidide suhtes tugev reaktsioon, eemaldatakse ta enne perifeersetesse kudedesse migreerumist, et vältida immuunrännakuid organismi enda rakkude ja kudede vastu.

Kehaomaste peptiidide ekspresseerimine toimub tüümuse säsi rakkudes ning selle protsessi eest vastutab suures osas autoimmuunsuse regulaator valk AIRE. AIRE vajab transkriptsiooni reguleerimiseks mitmeid partnervalke, mis võimaldavad tal kromatiinile seonduda ja seda remodelleerida ning osaleda ka transkriptsiooni initsiatsioonil ja elongatsioonil. Paljusid nendest interaktsioonipartneritest on AIRE kontekstis vähe uuritud, mistõttu on lõplikud AIRE geeniregulatsiooni mehhanismid ebaselged.

Valkude funktsionaalseid uuringuid tehakse tihti neile vastavate geenide ekspressiooni mahasurumisega, et näha, milline mõju on valgu puudumisel rakulistele protsessidele. Selles töös on kasutusele võetud CRISPR-Cas süsteemil põhinev CRISPRi (CRISPR interferents) meetod, mis kasutab dCas9-KRAB liitvalku, et valitud geenide ekspressiooni alla reguleerida.

Töös analüüsitakse CRISPRi meetodil toimivaid mudelsüsteeme ning otsitakse seoseid, kuidas AIRE interaktsioonipartnerite geeniekspressiooni vaigistamine mõjutab AIRE sihtmärkgeenide avaldumist.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Immuuntolerantsus

Immuunsüsteemi põhiülesandeks on pakkuda peremeesorganismile kaitset patogeenide eest sealjuures teda ennast kahjustamata. Selle tulemusena tekib organismis immuuntolerantsus: võime hoida ära immuunreaktsioone enda kehast pärit valkude ja muude molekulide vastu, mida kollektiivselt nimetatakse ka autoantigeenideks. Kui aga immuunsüsteem asub hävitama organismi enda rakke ja kudesid, on tegemist autoimmuunsusega. (Schwartz, 2012) Immuuntolerantsuse keskseks tekkemehhanismiks on tümotsüütide küpsemine tüümuses, millega takistatakse oma keha ründavate autoreaktiivsete T-rakkude migratsiooni perifeersetesse kudedesse. Peamisteks osalevateks rakutüüpideks on tüümuse kortikaalsed ja medullaarsed epiteelirakud: vastavalt cTEC-id (*cortical thymic epithelial cells*) ja mTEC-id (*medullary thymic epithelial cells*). (Kurd ja Robey, 2016)

Tüümuse koostises ehk korteksis toimub T-rakkude positiivne selektsioon. Luuüdist pärinevate tümotsüütide eellasrakkude esimene samm diferentseerunud T-rakkude suunas on T-raku retseptori ehk TCR-i (*T cell receptor*) ning CD4 ja CD8 retseptorite ekspresseerimine raku pinnal. Tümotsüüdi järgmiseks ülesandeks on TCR-i abil ära tunda cTEC-ide pinnal asuvaid autoantigeenidega kompleksis olevaid I ja II klassi peamiste koesobivuskomplekside MHC I ja MHC II (*major histocompatibility complex*) molekule. Kui TCR-i ning MHC molekuli vaheline interaktsioon puudub, suunatakse tümotsüüt apoptoosi. Mõõduka interaktsiooni järel jääb tümotsüüt ellu ning areneb edasi kas CD4+ või CD8+ positiivseks tümotsüüdiks. (Klein *et al.*, 2009; Kurd ja Robey, 2016)

Peale positiivset selektsiooni liiguvad tümotsüüdid tüümuse säsisse, kus toimub mTEC-ide poolt vahendatud tümotsüütide negatiivne selektsioon. CD4+ või CD8+ rakud viibivad säsises 4-5 päeva (McCaughy *et al.*, 2007). Selle aja sees ekspresseerivad mTEC-d tuhandeid organismi enda autoantigene, millest paljud on koespetsiifilised (TRA, *tissue restricted antigen*) (Derbinski *et al.*, 2001). TRA-d lõhutakse peptiidideks, mida esitletakse MHC I ja II komplekside kaudu tümotsüütidele (Blum *et al.*, 2013) Seejuures on huvitav märkida, et mTEC-id võivad osad peptiid-MHC kompleksid üle kanda ka dendriitrakkudele (Kurts *et al.*, 2010). Tümotsüüdid, mis reageerivad väga tugevalt TRA-dega ja on seetõttu potentsiaalselt autoreaktiivsed, hävitatakse apoptoosi teel (Starr *et al.*, 2003). Enamike TRA-de ekspressiooni reguleerib valk nimega autoimmuunsuse regulaator (AIRE, *Autoimmune regulator*) (Anderson *et al.*, 2002).

## 1.2 AIRE geen ja valk

AIRE on transkriptsiooni regulaator, mis aktiveerib tüümuse säsi epiteelirakkudes rohkem kui 3000 geeni ekspressiooni (Sansom *et al.*, 2014). Inimese *AIRE* geen asub 21. kromosoomi 22q.3 regioonis (Nagamine *et al.*, 1997) ning *AIRE*-sõltuvad geenid asuvad kromosomaalsetes klastrites (Gotter *et al.*, 2004). *AIRE* valk osaleb ka alternatiivses mRNA splaissimises, mis võimaldab mitmekesist autoantigeenide esitlemist (Danan-Gotthold *et al.*, 2016). *AIRE* asub tuumakehakestes (Bjorses *et al.*, 1999) ning assotsieerub ka tuumamaatriksiga (Tao *et al.*, 2006). Koespetsiifiliste antigeenide ekspressiooni hoitakse mTEC-des sellisel tasemel, mis oleks tüümuse füsioloogiale turvaline, kuid immuuntolerantsuse tekkeks efektiivne (Derbinski *et al.*, 2008). Selleks on *AIRE*-l võime multimeriseerumise ning histoonidele seondumisega represseerida ligipääsetavust kromatiinile. Nii limiteerib *AIRE* TRA-de ekspressiooni kestust ja taset ning ka rakkude arvu, mis kindlat TRA-d ekspresseerivad. (Koh *et al.*, 2018) Iga TRA-d ekspresseeritakse umbes 1-3 protsendis juhuslikes mTEC rakkudes (Derbinski *et al.*, 2008), sealjuures ekspresseerib iga mTEC mitut TRA-d ning nende ekspressioon on ajutine (Pinto *et al.*, 2013). *AIRE* valku toodetakse ka sekundaarsetes lümfoidorganites, kuid selle funktsioon on teadmata (Eldershaw *et al.*, 2011).

*AIRE* valgul on mitmeid funktsionaalseid domeene: kaspase aktiveeriv ja värbav domeen CARD (*caspase recruitment domain*), tuuma lokalisatsiooni signaal (NLS, *nuclear localization signal*), SAND (Sp100, *AIRE*-1, NucP41/75, DEAF-1) domeen, kaks PHD (*plant homeodomain*) tsinksõrme tüüpi domeeni ja neli LXXLL motiivi. Need domeenid võimaldavad interaktsioone mitmete valkudega. (Perniola ja Musco, 2014) SAND domeen vahendab Aire seondumist ATF7ip (*activating transcription factor 7 interacting protein*) valguga, mis kompleksis MBD1 (*Methyl-CpG-binding domain protein 1*) valguga juhatab Aire metüleeritud CpG saarte piirkondades asuvate sihtmärkgeenideni (Waterfield *et al.*, 2014). LXXLL motiivid on iseloomulikud valkudele, mis osalevad transkriptsioonis koaktivaatori või korepressorina (Plevin *et al.*, 2005). Nad vahendavad interaktsioone teiste LXXLL motiivi kandvate valkudega, nagu näiteks CBP (*CREB-binding protein*) (Torchia *et al.*, 1997). PHD1 domeen tunneb ära ja seostub histoon H3 4. positsioonis olevatele metüleerimata lüsiinidele (Org *et al.*, 2008). PHD2 on aga positiivselt laetud ning seega histoonidega ei interakteeru, kuid on *AIRE* tööks siiski hädavajalik. Mutatsioonid *AIRE*-PHD2 järjestuses põhjustavad *AIRE* sihtmärkgeenide ekspressiooni langust. (Gaetani *et al.*, 2012)

### 1.3 AIRE partnervalgud

AIRE aktiveerib geeniekspressiooni, olles osa multimolekulaarsest kompleksist. AIRE jõuab tuuma, interakteerudes tuumapoori kompleksiga assotsieeruvate valkudega, nt RANBP2 (*RAN binding protein 2*) (Abramson *et al.*, 2010). Seal värvatakse ta geenide transkriptsiooni alguskohtadesse (TSS, *transcription start site*), mis kannavad repressiivseid kromatiini modifikatsioone nagu metüleerimata histoon H3 4. lüsiinijääk (H3K4me0) (Org *et al.*, 2009) ning trimetüleeritud histoon H3 27. lüsiinijääk (H3K27me3) (Sansom *et al.*, 2014). Topoisomeraasid (TOP2A ja TOP2B) teevad seejärel TSS-i kaheaheelalisi DNA katkeid, mille initsieeritud kromatiini muutused värbavad kohale DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) ja PARP1 (*Poly[ADP-ribose]polymerase 1*) valgud. DNA-PK, mis koosneb DNA-PK katalüütilisest subühikust ning Ku70 ja Ku80 valgust (Smith and Jackson, 1999), fosforüülib AIRE-t (Liiv *et al.*, 2008) ning osaleb DNA katkete parandamisel mittehomooloogsete otste ühendamise läbi (NHEJ, *non-homologous end joining*) (Dobbs *et al.*, 2010). See, et AIRE funktsioon sõltub kaheaheelalistest DNA katketest, ilmneb ka interaktsioonist histooniga H2A.X, mis on iseloomulik DNA katkete toimumiskohtadele (Abramson *et al.*, 2010). PARP1 modifitseerib histooni H1, mille tulemusel see eemaldatakse promootoritelt ning kromatiini struktuur lõdveneb (Ju *et al.*, 2006; Abramson *et al.*, 2010). AIRE partnervalkudeks on ka teisi kromatiini remodelleerijaid, nagu RuvBL1 (*RuvB-like 1*) ja RuvBL2 (*RuvB-like 2*) (Gaetani *et al.*, 2012) ning KAP1 (*KRAB-associated protein-1*) (Abramson *et al.*, 2010). Ka lamiin B1 (LMNB1, *lamin B1*) on AIRE-ga interakteeruv partner (Abramson *et al.*, 2010). Lamiinid on tuumamaatriksi komponendid, mis on platvormiks transkriptsioonifaktorite kromatiinist eemal hoidmiseks (Heessen ja Fornerod, 2007). AIRE partnervalk CBP atsetüleerib AIRE CARD domeeni. Atsetüleeritud CARD domeen võimaldab omakorda BRD4 (*bromodomain containing protein 4*) valgu seondumist Aire-ga, mis on sillaks Aire ja P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) vahel. (Yoshida *et al.*, 2015) Samas on ka näidatud, et AIRE seondub P-TEFb-ga BRD4-st sõltumatult (Huang *et al.*, 2018). Igal juhul näitab interaktsioon P-TEFb-ga, et AIRE osaleb geeniekspressiooni regulatsioonis ka transkriptsiooni initsiatsiooni järgselt (Oven *et al.*, 2007).

### 1.4 APS1

AIRE geeni mutatsioonide tagajärjel ekspresseeritakse ainult väike osa TRA repertuaarist (Anderson *et al.*, 2002), mis viib APS1 (autoimmuunne poliendokriinne sündroom 1) ehk APECED (autoimmuunne poliendokriinne kandidoos ektodermaalne düstroofia) tekkele (Husebye *et al.*, 2009). AIRE geenis on identifitseeritud üle 100 erineva mutatsiooni, millest

kõige levinum on varajast stoppkoodonit põhjustav R257X, mida leidub peamiselt Soome ja Ida-Euroopa patsientides (Orlova *et al.*, 2010). Sündroomi olulisemateks sümptomiteks on hüoparatiireoidism, primaarne neerupealiste puudulikkus (Addison'i tõbi) ja krooniline mukokutaanne kandidoos (Husebye *et al.*, 2009). Patsientidel tekivad autoantikehad 1. tüüpi interferoonide IL-17A, IL-17F ja IL-22 vastu, mis on olulised tsütokiinid põletikuprotsessides ja *Candida* infektsiooni vastases kaitses (Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010). Kuigi APS1 patsiendid kannavad tavaliselt *AIRE* mutatsioone mõlemas alleelis, on leitud ka monoalleelse *AIRE* mutatsiooniga patsiente. Mõned nendest mutatsioonidest väljenduvad leebemate autoimmuunsete haiguste fenotüüpidenä, mistõttu võib *AIRE* geeni mutatsioonide kandlus olla suurem kui seni arvatud. (Ofstedal *et al.*, 2015)

### 1.5 CRISPR/Cas süsteemi bioloogiline mehhanism

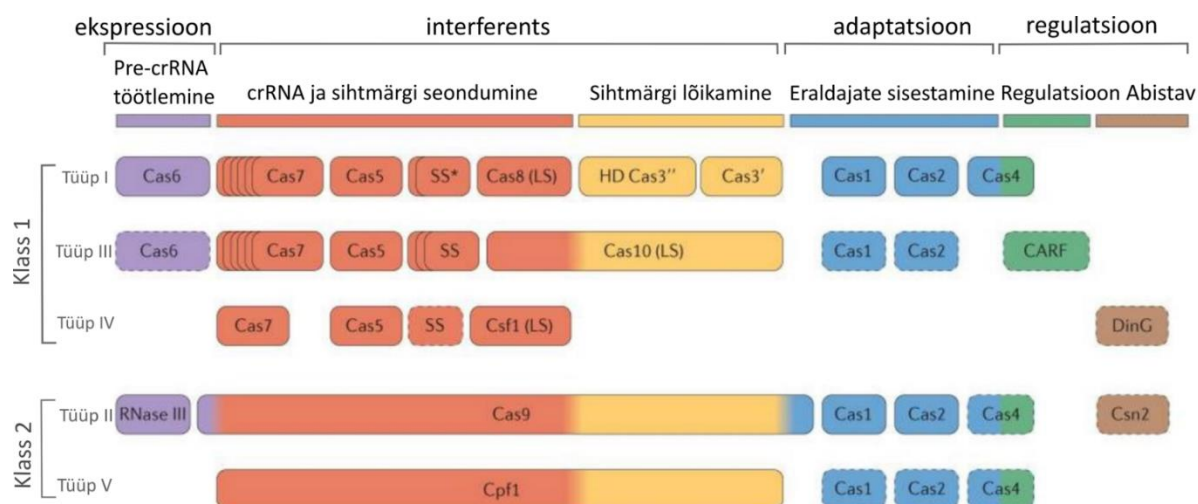
CRISPR-Cas on prokarüootide adaptiivne immuunsüsteem, mis kasutab RNA-juhitud nukleaase, et lõigata võõraid geneetilisi elemente (Garneau *et al.*, 2010). CRISPR-Cas tööprintsibi põhjal on välja töötatud geenitehnoloogiline meetod, mis võimaldab nii eukarüootide kui prokarüootide genoomiga manipuleerimist ning transkriptsiooni reguleerimist.

Esimest korda kirjeldati CRISPR lookust 1987. aastal, mil *E. coli* genoomist leiti kordusjärjestusi, mis vaheldusid lühikeste mittekonserveerunud järjestustega (Ishino *et al.*, 1987). Suuremate avastusteni jõuti võrdleva genoomika uuringutega, kus leiti, et lähedases suguluses olevate *Streptococcus thermophilus*'e tüvede genoomides leiduvad ülivarieeruvad alad, mis on klasterdunud regulaarsete vahedega lühikesteks palindroomseteks kordusteks. Tulenevalt inglisekeelsest kirjeldusest „*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*“ nimetati antud piirkonnad CRISPR lookusteks. (Jansen *et al.*, 2002)

CRISPR lookused koosnevad ühesuunalistest mittekontiigsetest kordustest, mille vahele jäävad varieeruvad eraldajajärjestused (ingl k *spacer*). CRISPR lookuste kõrval asuvad *cas* ehk CRISPR-assotsieerunud (ingl k *CRISPR-associated*) geenid. (Jansen *et al.*, 2002) Mitmete *in silico* analüüsidega on leitud, et CRISPR lookuses paiknevatel varieeruvatel DNA lõikudel on homoloogiaid bakteriofaagide ning plasmiidide järjestustega (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005). Aastal 2006 püstitati hüpotees, et CRISPR-Cas on prokarüootide kaitsesüsteem võitlemaks DNA ning RNA võõrelementidega RNA interferentsi (RNAi) põhimõttel. Hüpoteesini jõuti peale mitmete *cas* geenide kodeeritud Cas valkude avastamist, mis osalevad nii võõra pärilikkusaine lagundamisel kui ka uute eraldajate lisamisel CRISPR lookusesse. (Makarova *et al.*, 2006) Järgmisel aastal tõestati, et lisades CRISPR lookusesse

ühel kindlast bakteriofaagist pärit DNA eraldajajärjestus, muutub bakter selle faagi vastu resistents. See avastus kinnitas, et CRISPR-Cas on prokariotide adaptiivne immuunsüsteem. (Barrangou *et al.*, 2007)

Cas geenide poolt kodeeritud Cas valgud varieeruvad oluliselt liigiti. Nende põhjal on CRISPR-Cas süsteemid jagatud kaheks klassiks, millest klass 1 koosneb tüüpidest I, III ja IV ning klass 2 tüüpidest II ja V (joonis 1) (Makarova *et al.*, 2015).



**Joonis 1. CRISPR-Cas süsteemide klassifikatsioon.** Cas valgud jaotatakse kahte klassi, millest esimesse kuuluvad tüübid I, III ja IV ning teise tüübid II ja V. Klassideülevalt jagatakse valgud funktsiooni alusel nelja gruppi: ekspressioon, interferents, adaptatsioon ja regulatsioon. (Makarova *et al.*, 2015, modifitseeritud).

Cas valgud on klassideülevalt jagatud nelja funktsionaalsesse gruppi. Esimesse gruppi (ekspressioon) kuuluvad valgud töötlevad CRISPR-vahendatud immuunsuseks vajalikke mitteküpseid CRISPR RNA (pre-crRNA) molekule küpseteks crRNA-deks. Tüüp I ja III puhul on vastutavaks valguks Cas6 (Wang *et al.*, 2011), tüüp II puhul RNase III ning Cas9 (Deltcheva *et al.*, 2011). Teise gruppi (interferents) kuuluvad valgud osalevad nii võõr-DNA-ga seondumisel kui ka selle lõikamisel. Tüüp I ja III süsteemide puhul kannab seda funktsiooni crRNA efektorkompleks, mis koosneb mitmetest valkudest (Huo *et al.*, 2014; Samai *et al.*, 2015). Tüüp II süsteemides on sihtmärk-DNA lõikamiseks vajalik ainult Cas9 (Sapranauskas *et al.*, 2011). Kolmandasse gruppi (adaptatsioon) kuuluvad valgud sisestavad uusi eraldajajärjestusi CRISPR lookusesse. Nendeks valkudeks on igas alatüübis Cas1 ja Cas2 (Nuñez *et al.*, 2014), lisaks osalevad ka Cas4 (Hooton ja Connerton, 2015) ning tüüp II puhul

Cas9 (Heler *et al.*, 2015). Neljanda grupi valgud (regulatsioon) kannavad regulatoorseid või abistavaid rolle. Nende hulka loetakse CARF (*CRISPR-associated Rossmann fold*) domeeniga valgud, mille CARF domeen vahendab signaale võõr-DNA-d või -RNA-d lagundavate nukleaaaside aktiivsusega domeenide ning seondunud ligandide vahel (Makarova *et al.*, 2014). Samasse gruppi kuuluv Csn2 osaleb uute eraldajajärjestuste lisamisel CRISPR-lookusesse (Arslan *et al.*, 2013).

Kuna kõikidest CRISPR-Cas tüüpidest on tüüp II süsteem kõige paremini kirjeldatud ning vajab võõr-DNA lagundamiseks vaid ühte efektorvalku, on ka põhilised geenitehnoloogilised meetodid üles ehitatud tüüp II süsteemile.

Selle aluseks on iga eraldajajärjestuse kõrval asuv 2-5 aluspaari pikkune eraldajajärjestusega külgnev motiiv ehk PAM (*protospacer adjacent motif*) järjestus (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2009). Tüüp II CRISPR süsteemi puhul teeb Cas9 bakteriofaagide ja plasmiidide DNA-sse kaheahelalisi katkeid 3 nukleotiidi PAM-järjestusest 5' suunas (Garneau *et al.*, 2010). Tõeline läbimurre saabus katsetega, millega näidati, et kandes *Streptococcus thermophilus*'e tüüp II CRISPR/Cas9 süsteem üle *Escherichia coli*'le tekib ka *E. coli*'s vastav immuunsus. Nii veenduti, et kõik vajalikud CRISPR/Cas9 süsteemi osad olid identifitseeritud ning ühest liigist pärit süsteemi saab kasutada ka teistes liikides. (Sapranaukas *et al.*, 2011)

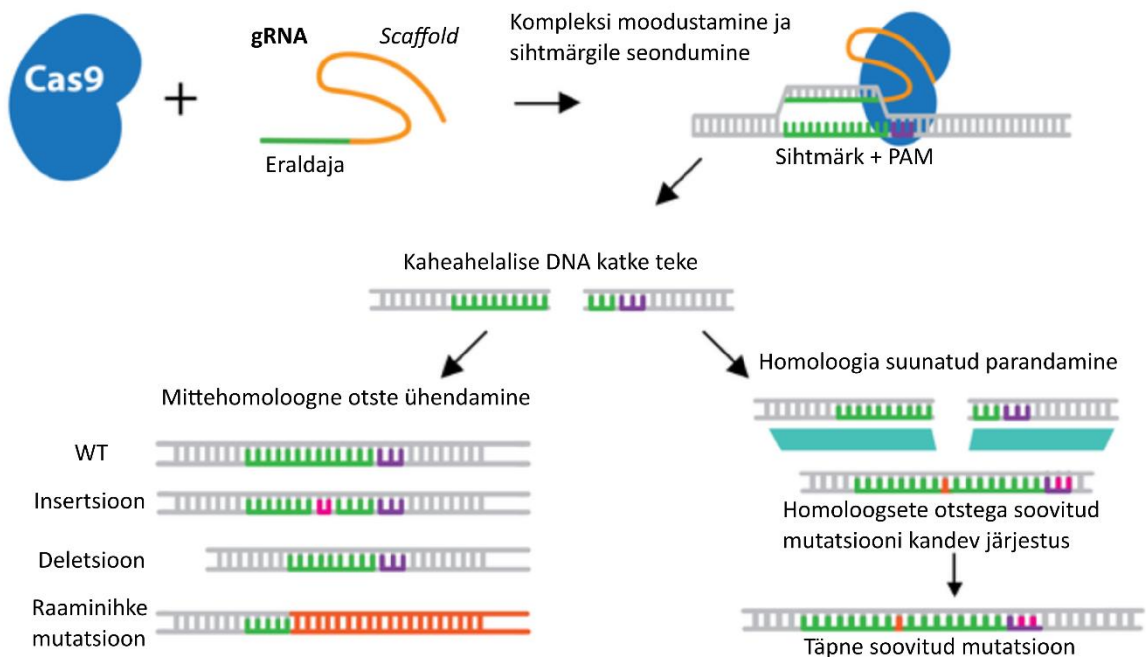
Üheks CRISPR-vahendatud immuunsuse võtmesündmuseks on CRISPR lookusest transkribeeritud pre-crRNA töötlemine tracrRNA (*trans-activating crRNA*) abil küpseks crRNA-ks. Pre-crRNA on pikk RNA molekul, mis sisaldab mitmeid eraldajajärjestusi, mis on pärit eksogeensetest nukleiinhapetest, millega bakter on eelnevalt kokku puutunud. TracrRNA transkribeeritakse CRISPR lookuse suhtes vastasahelalt ning see kannab komplementaarseid RNA lõike CRISPR lookuses asuvate kordusjärjestustega. Järgnevalt toimub pre-crRNA ning tracrRNA omavaheline seondumine osalise komplementaarsuse alusel. Tekkinud dupleksit lõikab Rnaas III ning tulemuseks on crRNA:tracrRNA kompleks, mis sisaldab ainult ühte eraldajajärjestust. (Deltcheva *et al.*, 2011) See kompleks saab seejärel seonduda Cas9 valguga ning moodustunud ribonukleoproteiinkompleks leiab eraldaja ja PAM järjestuste järgi üles rakku tunginud võõr-DNA. Cas9 valgu HNH (histidiin, asparagiin, histidiin) nukleasne domeen lõikab seejärel võõr-DNA komplementaarset ahelat ja RuvC-sarnane domeen mittekomplementaarset ahelat (Jinek *et al.*, 2012).

## 1.6 CRISPR-Cas9 kasutamine molekulaarbioloogias

Kõik eelnevad avastused on sillutanud teed praeguseks ühe enimkasutatud mutageense geenitehnoloogilise meetodini. CRISPR-Cas9 lihtsustamiseks on välja töötatud süsteem, mis

kasutab crRNA ning tracrRNA liittranskripti. Seega on kahe RNA asemel vajalik vaid üks juhtiv RNA, gRNA (*guide* RNA) (Jinek *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013). Sealjuures nimetatakse tracrRNA-d ka gRNA raamiks (*scaffold*), kuna selle eesmärgiks on gRNA ning Cas9 molekuli kompleksiks seondamine (Karvelis *et al.*, 2013). Selline lähenemine kaotab vajaduse CRISPR süsteemi kuuluvate RNA-töötlemises osalevate valkude kasutamise järele ning hõlbustab süsteemi kasutamist molekulaargeneetilise tööriistana.

Kõige enam kasutatakse geenijärjestuste muutmiseks tüüp II CRISPR süsteemi ning bakterist *Streptococcus pyogenes* pärit Cas9 valku (Cho *et al.*, 2013). Mutatsioonide tekitamiseks tuleb esmalt disainida huvipakkuva regiooni vastu sobilik gRNA. Cas9/gRNA kompleks seondub seejärel gRNA sihtmärgiks olevale kaheahelalisele DNA lõigule. Seondumiseks on vajalik, et gRNA sihtmärkjärjestusele järgneks PAM järjestus. Seejärel teeb Cas9 PAM-ist 3 aluspaari 5' suunas kaheahelalise DNA katke, mida rakud saavad parandada kahel viisil: NHEJ ning homoloogia poolt suunatud parandamine (HDR, *homology-directed repair*). (Cho *et al.*, 2013) NHEJ kasutamise tagajärjeks on lühikeste indel-mutatsioonide tekkimine lõikekohtadesse, mis võib viia raaminihke mutatsiooni tekkeni (Hefferin ja Tomkinson, 2005). Homoloogilise rekombinatsiooni korral on võimalik lõikekohtadesse viia eksogeense DNA põhjal uusi järjestusi (*knock-in*), tekitades lõikekohas spetsiifilisi mutatsioone (joonis 2) (Capecchi, 1989).



**Joonis 2. CRISPR-Cas9 süsteemi vahendatud mutatsioonide tegemine.** Cas9 ja gRNA kompleksi moodustamise järel seondub kompleks sihtmärkjärjestusele, kuhu Cas9 teeb

kaheaheelalise DNA katke. See parandatakse kas mittehomooloogse otste ühendamise või homoloogia suunatud parandamise läbi. Esimesel juhul tekivad sihtmärkjärjestusse juhuslikud mutatsioonid, teisel juhul viiakse lõikekohta soovitud DNA järjestus. (<https://www.addgene.org/crispr/history/>, modifitseeritud)

## 1.7 CRISPR-Cas süsteemi edasiarendused

CRISPR-Cas9 süsteemist on tehtud ka mitmeid edasiarendusi. Need baseeruvad katalüütiliselt „surnud“ (ingl k *dead*) Cas9 molekulil (dCas9), mille RuvC1 ja HNH nukleaasi domeenidesse on viidud mutatsioonid (vastavalt D10A ja H841A), mistõttu ei ole dCas9 enam võimeline sihtmärk-DNA-d lõikama. Küll aga on dCas9 jätkuvalt võimeline gRNA juhtimisel DNA-ga kohtspetsiifiliselt seonduma. (Qi *et al.*, 2013)

Üks CRISPR-dCas9 alaliikidest on CRISPR-l põhinev interferents (CRISPRi), mille puhul on DNA-le seondunud gRNA:dCas9 füüsiliseks transkriptsiooni elongatsiooni takistuseks, pärssides RNA polümeraasil DNA-l liikumist ning vaigistades seeläbi bakterite geeniekspressiooni. (Qi *et al.*, 2013) Imetajarakkudes on aga geenide avaldumise tugeva vaigistamise ehk *knockdown* efekti saamiseks kasutusele võetud dCas9 versioon, mille N-terminaalse osa külge on seotud KRAB (ingl k *Krüppel-associated box*) repressordomeen ning mis on kompleksis transkriptsiooni alguskoha vastu disainitud gRNA-ga (Gilbert *et al.*, 2013). KRAB-domeen värbab promootorpiirkonda KAP1, HP1 (*heterochromatin protein 1*), histooni metüültransferaasi SETB1 (*SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1*) ning nukleosoomi remodelleeriva ja deatsetüleeriva kompleksi NuRD (*nucleosome remodeling deacetylase*), mis viivad antud piirkonnas heterokromatiini tekkele ning geeni vaigistamisele (Schultz *et al.*, 2001, 2002; Lupo *et al.*, 2013). Eksperimentaalselt on näidatud, et dCas9-KRAB liitvalguga on HEK293 rakkudes võimalik saavutada kuni 15-kordset geeni *knockdown* efekti (Gilbert *et al.*, 2013). Sealjuures saavutatakse suurim *knockdown* efekt disainides gRNA-d TSS'i suhtes vahemikku 50 aluspaari 5' suunas ning 300 aluspaari 3' suunas (Gilbert *et al.*, 2014).

CRISPR-dCas9 süsteemi on imetajarakkudes kasutatud ka geeniekspressiooni aktiveerimiseks (CRISPRa), lisades dCas9 valgule VP64 või VP16 transaktivaatoridomeen (Cheng *et al.*, 2013; Perez-Pinera *et al.*, 2013). Samuti on dCas9 molekulile liidetud epigeneetilisi modifikatsioone läbiviivaid domeene. Näiteks on histooni demetülaas LSD1 lisatuna dCas9 molekulile võimeline enhaanser piirkondade vastu disainitud gRNA juhtimisel gene repressseerima (Kearns *et al.*, 2015). Aktiveerivate epigeneetiliste modifikatsioonide tegemiseks on dCas9 valgule liidetud atsetüültransferaasi p300 katalüütiline domeen, mis



lisab histoon H3 27. lüsiinijäägile atsetüülühmi. Kasutades enhaanserite ja promootorite vastu suunatud gRNA-sid, tõuseb neis piirkondades H3K27ac tase, mis aitab kaasa transkriptsiooni aktivatsioonile. (Hilton *et al.*, 2015)

## 1.8 CRISPR/Cas9 süsteemi head ja vead

Kuigi CRISPR/Cas9 on tänapäeval üks eelistatuim molekulaarbioloogiline tööriist, on ka sellel meetodil omad vead. Süsteemi suurimaks probleemiks on järjestusspetsiifika, sest gRNA seondub sihtmärk-DNA-le ka mõne nukleotiidi valepaardumise korral (Jinek *et al.*, 2012). On ka näidatud, et paari nukleotiidi pikkuse mutatsiooni asemel võib CRISPR-Cas9 kasutamine tekitada genoomi mitme kilobaasi pikkuseid deletsioone (Kosicki *et al.*, 2018). HDR-vahendatud *knock-in* mutatsioonid toimuvad madala tõenäosusega (Xue *et al.*, 2014) ning nende tekitamise toetamiseks kasutatavatel NHEJ inhibiitoritel ning HDR-i soodustavatel vahenditel on rakkude elutegevusele inhibeeriv toime (Aird *et al.*, 2018). Lisaks võivad kaheahelalised DNA katked olla tsütotoksilised (Jackson, 2002) ning pöördumatud raaminihke mutatsioonid võivad rakkudele hädavajalike geenide uurimise keerukaks teha.

Samas on CRISPR/Cas9 süsteem aga mitmekülgne, paindlik, lihtne ning võrdlemisi odav viis geenijärjestuste muutmiseks ning geeniekspressiooni reguleerimiseks. Osaline geeniekspressiooni allareguleerimine dCas9 vahendatud *knockdown* meetodiga võimaldab ka raku elutegevuseks vajalike geenide uurimist. Teiseks eeliseks on dCas9 valguga puhul esinev väiksem ebaspetsiifiliste seondumiste arv (Gilbert *et al.*, 2014). Ka KRAB domeeni lisamine dCas9 valgule ei langeta seondumise spetsiifikat (Thakore *et al.*, 2015). Lisaks on samaaegselt võimalik manipuleerida mitme geeni ekspressiooniga ning CRISPRi ja CRISPRa meetodil uurida geenidoosi mõju erinevatele rakulistele protsessidele. (Dominguez *et al.*, 2016)

## 1.9 Tetratsükliiniga reguleeritav geeniekspressiooni süsteem

Tetratsükliiniga kontrollitavad geeniekspressiooni süsteemid on kasutusel nii baasteaduslikes uuringutes kui ka biotehnoloogias ning geeniteraapias. Need süsteemid võimaldavad geeniekspressiooni muutmist ja selle mõju uurimist ajas. Süsteemid jagunevad kaheks: Tet-Off süsteemides surutakse rakkudele tetratsükliini lisades geeniekspressioon maha, Tet-On süsteemides toimub tetratsükliini juuresolekul aga geeniekspressiooni aktivatsioon. Lisaks tetratsükliinile kasutatakse laialdaselt ka tema derivaati doksütsükliini. (Das *et al.*, 2016)

Tetratsükliiniga kontrollitav geeniekspressioon baseerub Gram-negatiivsete bakterite tetratsükliinivastase resistentsuse mehhanismil. Tetratsükliin eksporditakse bakterites rakust

välja TetA valguga abil, mille kõrge tase rakus on bakterile aga letaalne. Seetõttu on TetA ekspressioon tihedalt kontrollitud tetratsükliini repressori TetR poolt. TetR seondumine tetO järjestusele repressioneerib TetA ja ka TetR ekspressiooni. Tetratsükliini seondumine TetR-ga takistab aga TetR-l tetO saidile seondumise ning TetA ekspressioon on aktiveeritud. (Hillen ja Berens, 1994) Laialt kasutuses olevad Tet-Off ning Tet-On süsteemid baseeruvad *E. coli* TetR repressorvalgul ning tetO järjestusel (Gossen ja Bujard, 1992).

Tet-Off süsteemi keskseteks komponentideks on tetratsükliini kontrolli all olev transkriptsiooniline aktivaator tTA ning tetratsükliinitundlik promootor  $P_{tet}$ . Aktivaator tTA disainiti liites TetR valgule VP16 aktivatsioonidomeen.  $P_{tet}$  ehk TRE (*tetracycline response element*) koosneb seitsmest tetO järjestusest, millele järgneb minimaalne CMV promootor. Tetratsükliini puudumisel seonduvad tTA dimeerid TRE-le ning geeniekspressioon aktiveeritakse. Tetratsükliini olemasolul seondub see aga tTA aktivaatoriga, mille tagajärjel muutub tTA konformatsiooniline muutus, mistõttu ei saa tTA enam TRE-le seonduda ning geeniekspressioon on repressioneeritud. (Gossen ja Bujard, 1992)

Tet-On süsteemi jaoks on TetR-st juhusliku mutageneesi kaudu välja töötatud versioon, mis seondub tetO-ga doksütsükliini juuresolekul. Lisades saadud pöörd-TetR valguga VP16 aktivatsioonidomeen, on tulemuseks rtTA (*reverse tetracycline controlled transactivator*), mis seondub rtTA-sõltuvalt  $P_{tet}$  promootorile tetratsükliini juuresolekul, käivitades geeniekspressiooni (Gossen *et al.*, 1995).

Tet-On süsteem vajab maksimaalseks induktsiooniks 100 korda rohkem doksütsükliini kui repressioon tTA-ga. Süsteem oli ebaefektiivne ka kõrge taustaktiivsuse tõttu. Seega on Tet-on süsteemidele tehtud mitmeid edasiarendusi. *Tet-On Advanced* versioon (Clontech) kasutab aktivaatorina rtTA versiooni rtTA2<sup>S</sup>-M2, mis kõrvaldab doksütsükliini puudumisel geeni taustekspressiooni, on eukarüootides stabiilsem ning funktsioneerib 10 korda madalama doksütsükliini kontsentratsiooniga kui originaalne rtTA. (Urlinger *et al.*, 2000)

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli uurida võimalust vaigistada AIRE-ga interakteeruvate valkude avaldumist CRISPRi meetodil ja seeläbi mõjutada AIRE-sõltuvate geenide ekspressiooni.

Täpsemad eesmärgid olid:

1. Luua vajalikud plasmiidid selleks, et viia rakkudesse gRNA järjestused ning jälgida nende avaldumist
2. Luua rakuliinid, mis on võimelised stabiilselt ekspresseerima dCas9-KRAB valku doksütsükliiniga indutseerimise järel
3. Analüüsida, kui efektiivselt toimub AIRE-ga interakteeruvate valkude geeniekspressiooni vaigistamine CRISPRi meetodil, mõõtes seda mRNA tasemel
4. Analüüsida, kuidas mõjutab AIRE-ga interakteeruvate valkude geeniekspressiooni vaigistamine AIRE poolt reguleeritud geenide avaldumist

### 2.2 Materjalid ja metoodika

#### 2.2.1 Bakteritüvi ja rakuliinid

Plasmiidse DNA paljundamiseks kasutati *E. coli* bakteritüve Nova XG (F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mcrC*–*mrr*) *endA1* *recA1*  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacX74* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG*  $\lambda$ –*tonA*).

Transientsed transfektsioonid tehti rakuliiniga AIRE-HEK/Tet, mis ekspresseerib AIRE valku doksütsükliiniga indutseerimise järel (Liiv *et al.*, 2012). AIRE-HEK/Tet rakke kasutati ka uute rakuliinide tegemiseks, mis doksütsükliini lisamisel ekspresseeriksid nii AIRE kui ka dCas9-KRAB valku.

#### 2.2.2 Söötmed

Baktereid kasvatati Lurian-Bertani (LB) vedelsöötmes (trüptoon 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l) ja agartassidel (10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar 15 g/l), lisades sõltuvalt plasmiidist kas ampitsilliini või kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Kasvatused tehti 37 °C juures.

Inimese rakuliine kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza Bioscience) söötmes, millele oli lisatud 10% tetratsükliinivaba veise loote seerumit (HyClone) ning 1% penitsilliini ja streptomütsiini segu (Corning).

### 2.2.3 Kloneerimine

#### Restriksioon

Töös kasutatud restriктаasid ning puhvrid olid firmalt Thermo Fisher. Reaktsioonisegu maht oli 20 µl ja see sisaldas 1 µg DNA-d, 10 U restriктаasi, 2 µl 10x restriктаasi puhvrit ning vett. DNA restriksiooni reaktsioonid viidi läbi 37 °C juures. FastDigest ensüümide ja puhvrite korral inkubeeriti restriksioonisegu 5-10 min, teiste ensüümide ja puhvrite korral üks tund.

#### Agaroosgeelelektroforees

PCR, restriksioonanalüüsi- ja kloneerimisproduktide kontrolliks kasutati agaroosgeelelektroforeesi. Sõltuvalt uuritavate DNA järjestuste pikkusest kasutati 0,8-1% agaroosgeeli, mille valmistamisel kasutati 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8), vastav kogus agaroosi ja etiidiumbromiidi (0,5µg/ml).

#### Transformatsioon bakterirakkudesse

Külmutatud bakterirakkude suspensioon sulatati 5 min jääl. Bakteritele lisati 0,5 µl plasmiidset DNA-d ning segu inkubeeriti 30 min jääl, millele järgnes kuumašokk 3 min 37 °C juures ning rakud asetati tagasi jääle. Peale 1 ml LB söötme lisamist inkubeeriti rakke 30 min 37 °C juures ja tsentrifuugiti 3500 x g juures 3 min. Rakusade külvati selektiivse antibiootikumiga LB-tardsöötmele.

#### Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest

Bakterirakke kasvatati selektiivse antibiootikumiga LB-tardsöötmele üleöö. Sealt valiti välja üksikkolooniad, mida kasvatati sama antibiootikumiga 2 ml LB-vedelsöötmes 18 h. Bakterirakud tsentrifuugiti 3500 x g juures 3 min ning plasmiidne DNA puhastati GeneJET Plasmid Miniprep Kit'iga vastavalt tootjapoolsele protokollile (Thermo Scientific). Suurema koguse tootmiseks kasvatati üksikkolooniaid selektiivse antibiootikumiga 100 ml LB-vedelsöötmes 20 h, bakterirakud sadestati 4000 x g juures 15 min ning plasmiidne DNA puhastati NucleoBond Xtra Midi EF kit'iga tootjapoolse juhendi järgi (Macherey-Nagel).

### 2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon

DNA järjestused amplifitseeriti PCR (*polymerase chain reaction*) ja koloonia-PCR meetodil. Selleks segati kokku reaktsioonisegud, mis on välja toodud Tabelis 1. PCR programm ning praimerite järjestused on välja toodud Lisas 4.

**Tabel 1.** PCR ja koloonia-PCR reaktsioonisegud.

PCR	Koloonia-PCR
2,5 µl 10x yellow buffer	2,5 µl 10x yellow buffer
1,5 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
1,5 µl dNTP	1,5 µl dNTP
1 µl DNA polümeraas	1 µl DNA polümeraas
1 µl EGFP-R praimer (5 µM)	1 µl eGFP F praimer (5 µM)
1 µl EGFP-F praimer (5µM)	1 µl R1 (pcDNA3.1 BGH) praimer (5µM)
16,5 µl vett + 2,1 µg pEGFP-N1 plasmidi	16,5 µl vett + külvinõela puudutuse jagu bakterirakke

### 2.2.5 pX330-EGFP plasmidi kloneerimine

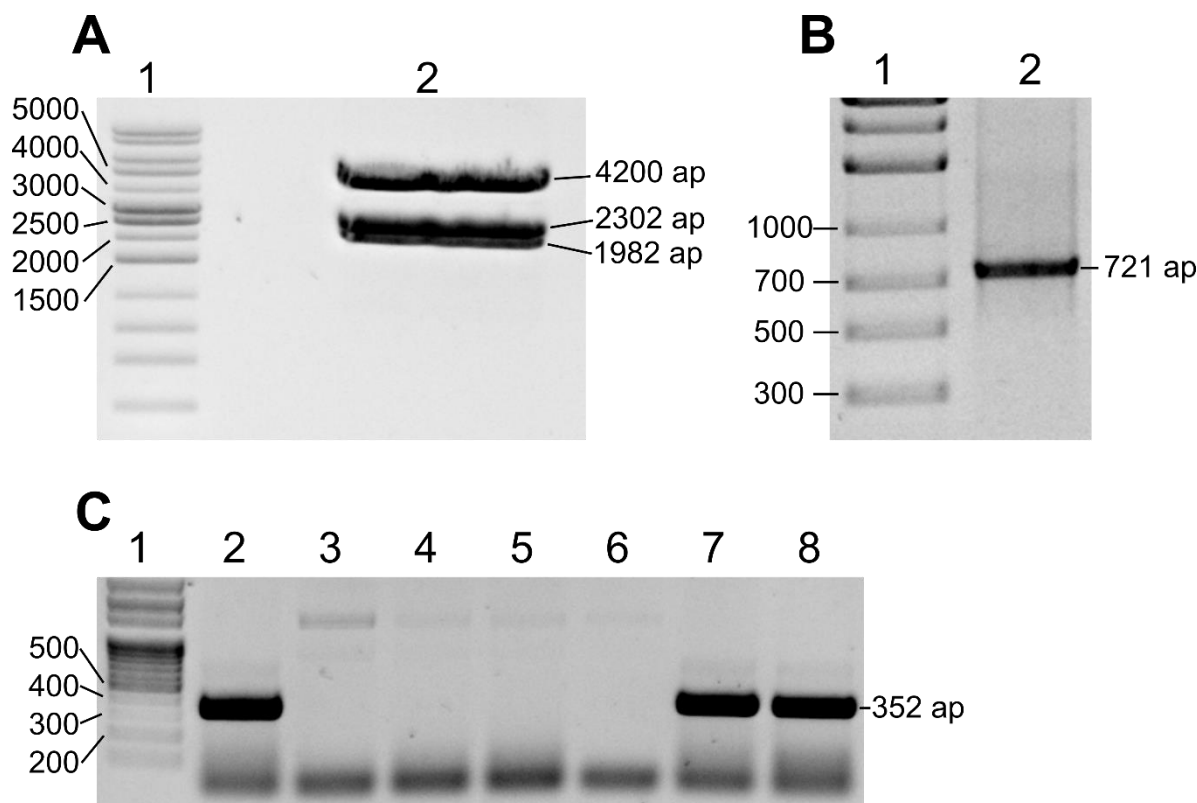
gRNA-de vektorina kasutatud pX330-EGFP plasmidi kloneerimist alustati pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 plasmiidist, millest eemaldati AgeI, EcoRI ning EcoRV restriктаasidega hSpCas9 järjestus (Lisa 1.2). Plasmidi fragmendid eraldati agarosgeelelektroforeesil ning 4200 aluspaari pikkune plasmidi keha puhastati geelist GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit'iga vastavalt tootjapoolsetele juhenditele (Thermo Scientific) (Joonis 3A).

EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) valku kodeeriv DNA järjestus amplifitseeriti pEGFP-N1 plasmiidilt EGFP-R ja EGFP-F praimeritega PCR meetodil (Lisa 1.4 ja 4). PCR-i õnnestumist kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga ning 721 aluspaari pikkune EGFP fragment puhastati geelist GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit'iga vastavalt tootjapoolsetele juhenditele (Joonis 3B).

Kuna pX330 plasmiid oli lineariseeritud AgeI ja EcoRI restriктаasidega tehti samade ensüümidega restriksioonlõikus ka EGFP-fragmendile, et fragmentide otsad saaksid omavahel ligeeruda. Selleks oli EGFP-fragmendi amplifitseerimisel kasutatud praimerite otstesse lisatud vastavate restriктаaside lõikesaidid (Lisa 4). Lõigatud otstega EGFP fragment puhastati restriksioonisegust QIAquick PCR Purification Kit'iga. Järgnevalt ligeeriti pX330 ning EGFP fragmendid omavahel kokku. Ligatsioonisegu sisaldas 25 ng pX330 vektori keha, 21,25 ng EGFP fragmenti, 1U T4 ligaasi, 2 µl T4 puhvrit ning 20 µl-ni vett. Ligatsioonisegu inkubeeriti 1 h toatemperatuuril.

pX330-EGFP plasmidi kloneerimise õnnestumist kontrolliti koloonia-PCR meetodiga. Selleks transformeeriti plasmiid kompetentsetesse Nova XG *E. coli* rakkudesse. Üleöö

kasvanud rakkudest valiti välja seitse kolooniat, millest amplifitseeriti eGFP-F ning R1 (pcDNA3.1 BGH) praimeritega EGFP järjestus (Lisa 4). Kuna eGFP-F praimer seondus EGFP segmendile ning R1 praimer algas pX330 plasmiidis sisalduvale BGH järjestusele, oli koloonia-PCR'il tekkinud 352 aluspaari pikkune produkt märgiks, et pX330 vektor ja EGFP fragment olid kokkuligeerunud (Joonis 3C).



**Joonis 3. pX330-EGFP kloneerimise vaheetapid ja plasmidi õigsuse kontroll.** **A**, esimesel rajal on DNA marker (1 kb DNA ladder, Solis Biodyne), teisel rajal olevad kolm DNA fragmenti on tekkinud pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 plasmidi restriksioonil AgeI, EcoRI ning EcoRV restriктаasidega. 4200 aluspaari pikkune fragment tähistab plasmidi keha, mida kasutati kloneerimises pX330 vektorina. 2302 ja 1982 aluspaari pikkused fragmendid on pärit hSpCas9 fragmendist. **B**, esimesel rajal on DNA marker (1 kb DNA ladder, Solis Biodyne), teisel rajal on pEGFP-N1 plasmidist pärit PCR-iga amplifitseeritud 721 aluspaari pikkune EGFP järjestus, mida kasutati pX330-EGFP plasmidi kloneerimisel. **C**, esimesel rajal on DNA marker (100 bp DNA ladder, Solis Biodyne). Radadel 2-8 on seitsmest bakterikolooniast pärit pX330-EGFP plasmidi kontrolliks tehtud koloonia-PCR, millega amplifitseeriti 352 aluspaari pikkune EGFP fragment. Kloneerimine õnnestus kolooniates nr 2, 7 ja 8, millest edasi kasutati kolooniat nr 2. DNA proove analüüsiti 0,8% agarosgeelil.

### 2.2.6 gRNA proovide disain

gRNA-de disainiks kasutati CRISPR Targets 10K andmestikku, mis on kättesaadav UCSG Genome Browser'i kaudu (Kent *et al.*, 2002). Valikusse jäid järjestused, mis asusid transkriptsiooni alguskoha suhtes vahemikus kuni 50 aluspaari 5' suunas ning kuni 300 aluspaari 3' suunas. Kuna edaspidi vektorina kasutatavas pX330-EGFP plasmiidis algas gRNA transkribeerimine U6 promootorilt, mis on efektiivseim G-nukleotiidiga algavate järjestuste puhul, valiti välja kas sellega algav oligo või lisati G-nukleotiid ise gRNA järjestuse algusesse. Iga uuritava geeni kohta disainiti kaks gRNA-d, mille järjestused on leitavad Lisas 2.

### 2.2.7 gRNA järjestuste klonerimine vektorisse

gRNA järjestused kloneeriti eelpool kirjeldatud pX330-EGFP plasmidi koosseisu vastavalt varem avaldatud protokollile (Ran *et al.*, 2013), mida töö jaoks modifitseeriti. Esimese sammuna toimus iga gRNA oligote paari fosforüülimine ja kokkusulatatamine. Selleks segati kokku järgnev reaktsioonisegu: 0,5 µl 0,5 mM ATP, 1 µl oligo 1 (100 µM), 1 µl oligo 2 (100 µM), 1 µl PNK puhver A, 6 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl T4 PNK (Thermo Scientific). Ahelate kokkusulandamiseks inkubeeriti proove 30 min 37 °C juures, seejärel 5 min 95 °C juures ning järgnevalt langetati temperatuuri 5 °C/min kuni 25 °C-ni. Kokkusulatatud oligosid lahjendati 250 korda. Segati kokku reaktsioonisegu, kus toimus samaaegne restriksioon ning ligatsioon, mis sisaldas järgnevaid komponente: 100 ng pX330 vektorit, 2 µl fosforüülitud ja kokkusulatatud oligo dupleksit (250x lahjendus), 2 µl FastDigest puhvrit (Thermo Fisher), 2 µl 10 mM DTT, 2 µl 10 mM ATP, 1 µl FastDigest BbsI restriктаasi (Thermo Fisher), 1 µl T4 DNA ligaasi ning 9 µl ddH<sub>2</sub>O. Reaktsioonisegu inkubeeriti 5 min 37 °C juures, seejärel 5 min 23 °C juures ning seda tsüklit korrati 6 korda. Ensüümide inaktiveerimiseks hoiti proove 15 min 65 °C juures.

Klonerimise õnnestumist kontrolliti restriksioonanalüüsil, milles plasmide lõigati BbsI ning AgeI restriктаasidega. Kuna gRNA plasmidi sisenemisel kaob plasmidist BbsI lõikekoht, tekib restriksiooni järel lineaarne pX330-EGFP molekul. gRNA fragmendi mittesisenemise korral jääb aga lõikekoht alles ning plasmidist tekib kaks fragmenti. Fragmentide tekkimist kontrolliti 1% agarosgeeliga agarosgeelelektroforeesil.

Restriksioonanalüüsi kinnitamiseks sekveneeriti gRNA sisestamise koht ja sellega külgnevad järjestused. Sekveneerimine tehti Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi tuumiklaboris.

### 2.2.8 Transfektsioon ja doksütsükliiniga indutseerimine

AIRE-HEK/Tet ning HEK1.12 rakkude transfekteerimiseks kasvatati neid 24-kannuga plaadil DMEM söötmes 37 °C juures 5%-lisel CO<sub>2</sub> kontsentratsioonil kuni 50%-lise konfluentsuseni. Transfektsioonisegusse lisati 1 µg transfekteeritava plasmiidse DNA koguse kohta 2,5 µl lipofektamiini (Invitrogen), mis oli *vortex* meetodil lahustatud 50 µl DMEM söötmes ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Seejärel lisati segusse 1 µg plasmiidset DNA-d 50 µl DMEM söötmes, segati *vortex* meetodil ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Järgnevalt kanti 100 µl transfektsioonisegu igas kannus kasvavatele rakkudele ning rakke kasvatati samades tingimustes edasi. Rakke indutseeriti doksütsükliiniga 24 h peale transfektsiooni lisades söötmesse doksütsükliin lõppkontsentratsiooniga 2 µg/ml.

### 2.2.9 RNA puhastamine ja cDNA sünteesimine

RNA saamiseks kasvatati esmalt rakke 24-kannuga plaadil 500 µl DMEM söötmes, seejärel sööde eemaldati ning rakke pesti 1x PBS lahusega. Rakud lüüsi 500 µl Qiazol reagentiga (QIAGEN). Rakkudest RNA eraldamiseks kasutati kahte meetodit: isopropanooliga sadestamist ning RNeasy® Micro Kit'iga (QIAGEN) puhastust.

Isopropanooliga sadestamise korral inkubeeriti -80 °C juures säilitatud proove 5 min toatemperatuuril ning neile lisati 100 µl kloroformi. Proove hoiti jällegi 5 min toatemperatuuril ning sadestati 4 °C juures 13000 x g 15 min. Vesifaas, mis sisaldas ka eraldatavat RNA-d, tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning proovidele lisati 0,5 µl glükokeeni. RNA sadestati 250 µl isopropanooliga, proovid segati *vortex* meetodil ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. RNA tsentrifuugiti 4 °C juures 11000 x g 10 min tuubi põhja, supernatant eemaldati ning sadet pesti 500 µl 75% etanooliga. Lõpuks tsentrifuugiti 5 min 7500 x g juures RNA uuesti põhja, supernatant eemaldati ning RNA lahustati 12 µl RNAasi-vabas vees.

Komplementaarne DNA (cDNA, ingl k *complementary DNA*) sünteesiti SuperScript First Strand Synthesis System komplekti reagentidega vastavalt tootjapoolsele juhendile (Thermo Fisher).

### 2.2.10 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Geeniekspressiooni kvantiseerimiseks kasutati qPCR (ingl k. *quantitative polymerase chain reaction*) meetodit. Reaktsioonisegu sisaldas järgnevaid komponente: 14,6 µl H<sub>2</sub>O, 16,3 µl SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher), 1,5 µl *forward* + *reverse* praimer (5 µM), 1 µl cDNA. Tehniliste korduste jaoks jagati iga segu 384-kannuga plaadil 10 µl kaupa kolme kannu. Reaktsioonid viidi läbi ViiA™ 7 Real-Time PCR System masinas (Applied



Biosystems). SYBR® Green I seondub PCR-i käigus tekkiva kaheaheelalise DNA-ga ning DNA hulga korreleeruv mõõdetav fluorestsentssignaal kvantiseeritakse.

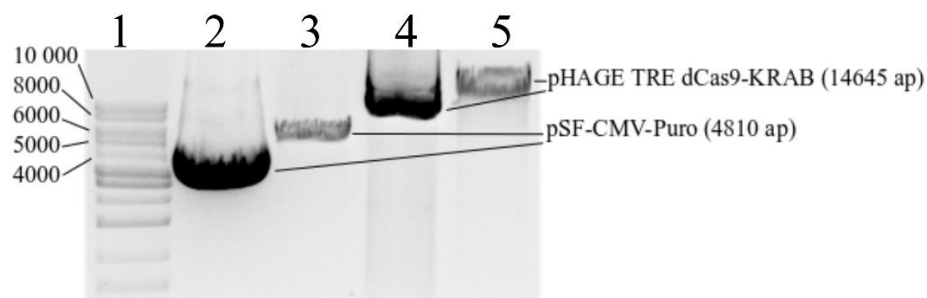
Vältimaks genoomse ning plasmiidse DNA kontaminatsiooni tõttu võimalike valeproduktide teket, disainiti katsetes kasutatavad ekspressioonipraimerid eksonite ühenduskohtadesse. qPCR-is kasutatud praimerid ning nende järjestused on välja toodud Lisas 3.

qPCR katse väljundiks on Ct (*threshold cycle*) väärtused, mis tähistavad PCR tsüklit, millest alates tekib mõõdetav fluorestsentssignaal. Proovidel, mille puhul jäi geeniekspressiooni tase määramatuks, kasutati olemasolevate väärtuste alusel arvutatud keskmist väärtust. Kõik qPCR-i tulemused esitati dCt väärtustena, mis tähendab, et kõikidest Ct väärtustest oli lahutatud koduhoidjageeni *HPRT1* Ct väärtus vastavas proovis. Sellega normaliseeriti geeniekspressiooni signaalid RNA hulga kõikumiste suhtes.

Statistilise võrdluse jaoks kasutati ANOVA mudelit, milles sõltuvaks tunnuseks oli dCT väärtus ja sõltumatuks tunnuseks oli transfektsioon, mida analüüsiti eraldi nii doksütsükliiniga indutseeritud kui ka indutseerimata proovides ja keskmistatult üle kolme katsekorduse. Nii gRNA sihtmärkgeenide kui ka AIRE-sõltuvate geenide ekspressiooni transfekteerimata ja gRNA transfektsiooniga proovides võrreldi kontrolltransfektsiooniga proovides detekteeritud signaali suhtes. Mitmese võrdluse korrigeerimiseks kasutati Dunnetti meetodit, mis arvestab statistilise mudeliga, milles mitut katsegruppi võrreldakse ühe kontrollgrupi suhtes. Statistiliselt olulisteks erinevusteks loeti analüüsitulemused siis, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05. Analüüsimiseks kasutati statistikatarkvara R (<https://www.r-project.org/>) ja selle lisapaketti emmeans (<https://cran.r-project.org/package=emmeans>).

#### **2.2.11 dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemine**

dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemiseks kotransfekteeriti AIRE-HEK/Tet rakuliini kaks plasmidi: puromütsiini resistentsusgeeniga pSF-CMV-Puro (Oxford Genetics) ning dCas9-KRAB geeni järjestusega pHAGE TRE dCas9-KRAB (kingitus Rene Maehr'i ja Scot Wolfe'i poolt, Addgene\_50917) (Lisad 1.3 ja 1.1). pSF-CMV-Puro plasmiid lineariseeriti SgsI ning pHAGE TRE dCas9-KRAB plasmiid SphI restriktasiga ja reaktsiooni õnnestumist kontrolliti agarosgeelelektroforeesil (joonis 4). Lineariseeritud plasmiidid puhastati restriktatsioonisegust, kasutades QIAquick PCR Purification Kit'i vastavalt tootjapoolsetele juhenditele (QIAGEN).



**Joonis 4. pSF-CMV-Puro ja pHAGE TRE dCas9-KRAB plasmiidide lineariseerimine. 1,** esimesel rajal on DNA marker (1 kb DNA ladder, Solis Biodyne), **2,** lineariseerimata pSF-CMV-Puro plasmiid. **3,** pSF-CMV-Puro plasmiid lineariseeritud kujul. **4,** lineariseerimata pHAGE TRE dCas9-KRAB plasmiid. **5,** pHAGE TRE dCas9-KRAB plasmiid lineariseeritud kujul. Plasmide analüüsi 0,8% agarosgeelil.

Lineariseeritud plasmiidid kotransfekteeriti AIRE-HEK/Tet rakuliini, sealjuures oli plasmiidide molekulide arv vahekorras 10:1 (vastavalt dCas9-KRAB ning puromütsiini resistentsusgeeni kandev plasmiid). Rakke kasvatati 10 päeva 10 cm läbimõõduga Petri tassil puromütsiini (lõppkontsentratsioon 3 ug/ml) sisaldavas DMEM söötmes ning kanti edasi 96-kannuga tassile tihedusega üks rakk kannu kohta. Kloone kasvatati 14 päeva ning söödet vahetati iga 2-3 päeva tagant. Seejärel tõsteti edukalt paljunenud rakud 12-kannuga tassile ning kolme päeva pärast 6-kannuga tassile. Kokku saadi edasiseks testimiseks 20 klooni. Klooni kontrolliks sooritati qPCR analüüs kõikidele 20 kolooniale. RNA puhastamiseks kasutati RNeasy® Micro Kit'i ning proovidele tehti ka DNAasi töötlus vastavalt tootjapoolsetele juhistele (QIAGEN).

#### **2.2.12 gRNA-de vahendatud AIRE-partnervalkude *knockdown* dCas9-KRAB liitvalku ekspresseerivas rakuliinis**

*Knockdown* eksperimentideks valiti eelnevalt välja rakuliin HEK1.12, mida kasvatati 24-kannuga plaadil puromütsiiniga DMEM söötmes 50% konfluentsuseni. Ühe geeni *knockdown*'iks kasutati samaaegselt kahte gRNA-d, sealjuures kasutati transfektsiooniks 500 ng kumbagi gRNA järjestust kandvat plasmidi. Doksütsükliini lisati rakkudele kaks korda: 24 h ning 72 h peale transfektsiooni. Peale 96 h möödumist koguti proovid RNA analüüsiks Qiazol reagenti. RNA puhastati isopropanooliga sadestades. Järgnenud DNAasi töötlus tehti RNeasy® Micro Kit'iga (QIAGEN).

### 2.2.13 AIRE-partnervalkude *knockdown* transientselt ekspresseerunud dCas9-KRAB liitvalguga

AIRE-HEK/Tet rakke kasvatati 24-kannuga plaadil 50% konfluentsuseni. Ühes kannus asuvaid rakke kotransfekteeriti 500 ng dCas9-KRAB järjestust kandva plasmiidiga ning kahe erineva gRNA järjestusega plasmiididega, kasutades kumbagi 250 ng. Peale 24 h möödumist indutseeriti rakke doksütsükliiniga. 72 h peale transfektsiooni koguti rakud Qiazoli reagenti ning 2x SDS puhvrissi. RNA puhastati RNeasy® Micro Kit'iga (QIAGEN).

### 2.2.14 Western blot totaalsest rakulüsaadist

Rakke kasvatati 24-kannuga plaadil, seejärel sööde eemaldati ning rakke pesti 1x PBS lahusega. Rakud võeti üles 2x SDS puhvriss ning proove kuumutati 5 minutit 96 °C juures. Seejärel kanti proovid 8%-lisele SDS-polüakrüülamidegeelile ning valgud lahutati üksteisest elektroforeesil (20 min 100 V ning 1 h 150 V). Valkude ülekandmiseks geelilt PVDF filtrile (0,45 µm poori läbimõõt) kasutati Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell masinat (BioRad). Ülekanne tehti 15 min 10 V ning 45 min 15 V juures. Vaba filtripind blokeeriti lõssi lahuses (10% lõssi lahustatud TTBS puhvriss (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)) loksudes üleöö 4 °C juures. Valkude detekteerimiseks inkubeeriti filtrit esmalt tund aega 10% lõssisisaldusega TTBS puhvriss lahustatud primaarse antikehaga, mis tunneb ära uuritava valgu struktuuris olevat epitoopi. Seejärel pesti filtrit 3x 5 min TTBS lahusega ning inkubeeriti primaarset antikeha äratundva sekundaarse antikehaga, mis oli samuti lahustatud 10% lõssisisaldusega TTBS puhvriss (Tabel 2). Filtrit pesti 3x 5 min TTBS lahusega, inkubeeriti 4 min Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent lahuses ning detekteerimiseks kasutati ImageQuant™ RT ECL™ masinat (mõlemad GE Healthcare).

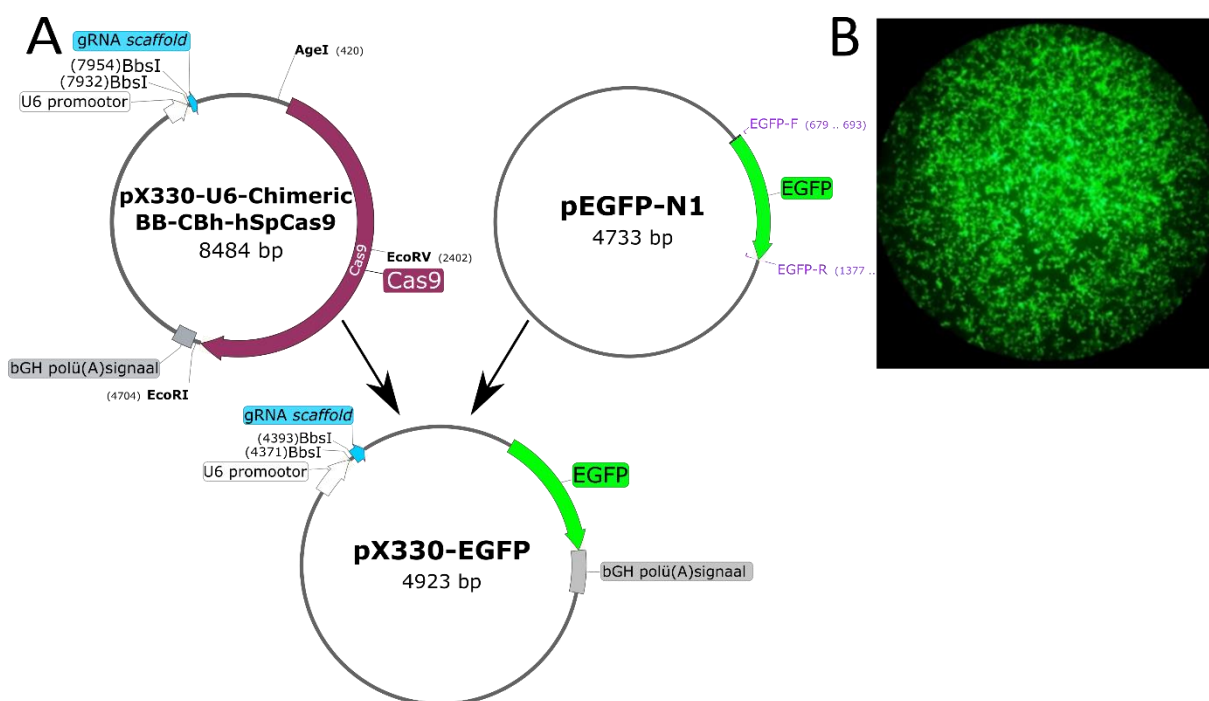
**Tabel 2. Töös kasutatud antikehad**

Valk	Antikeha	Lahjendus
dCas9-KRAB	Anti-Cas9 Antibody, clone 7A9 (Merck Millipore)	1:500
AIRE	AIRE 6.1 (mittekommertsiaalne)	1:3000

## 2. 3 TULEMUSED. ARUTELU

### 2.3.1 pX330-EGFP plasmiid ja gRNA järjestuste kloneerimine

CRISPR-dCas9 katsete toimumiseks on vajalikud nii dCas9 ensüüm kui ka gRNA-d. gRNA järjestuste ekspresseerimiseks loodi plasmiid, kuhu oleks lihtne gRNA järjestusi sisestada ning mille transfekteerumist oleks võimalik hõlpsasti kontrollida. Kloneerimist alustati pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 plasmiidist, mis sisaldab tugevat U6 promootorit, gRNA sisestamiseks vajalikku BbsI restriksioonisaiti ning gRNA ja dCas9-KRAB molekuli seondumiseks vajalikku gRNA *scaffold* järjestust. Plasmiid sisaldas ka hSpCas9 ensüümi kodeerivat järjestust (Lisa 1.2, vt ka ptk 2.2.5), mis ei olnud edasiste katsete jaoks vajalik. See asendati EGFP kodeeriva järjestusega, mis pärines pEGFP-N1 plasmiidist (Lisa 1.4, vt ka ptk 2.2.5). Tulemuseks oli sobilike omadustega pX330-EGFP plasmiid (Joonis 5A).



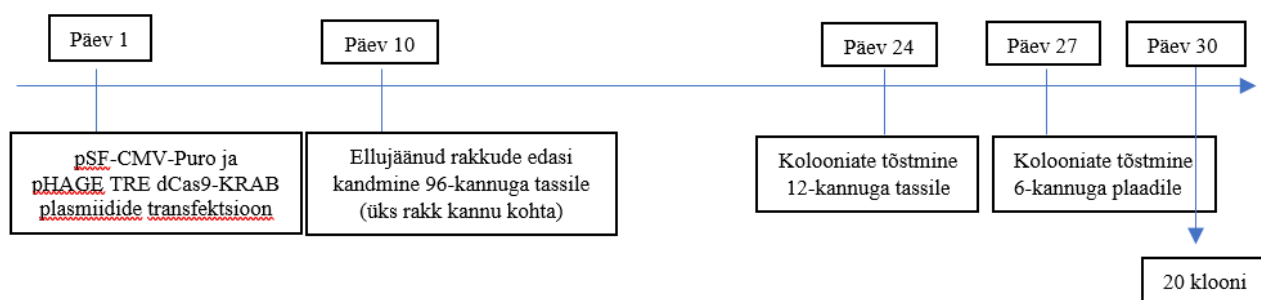
**Joonis 5. pX330-EGFP plasmidi kloneerimine ja transfektsiooni kontroll.** A, pX330-EGFP plasmidi skemaatiline esitus. pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 plasmiidist lõigati välja Cas9 järjestus ja lisati pEGFP-N1 plasmiidist pärit EGFP järjestus. B, pX330-EGFP plasmidi transfektsiooni efektiivsust kontrolliti AIRE-HEK/Tet rakuliinis visuaalselt EGFP fluorestsentsi alusel. Pilt on tehtud 100x suurendusega.

Töös kasutatud gRNA järjestused disainiti tuntud, kuid erineval määral uuritud AIRE interaktsioonipartnerite geenide transkriptsiooni alguskoha lähedusse. gRNA-de valiku aluseks olid proteoomika uuringud, milles leiti kokku ligi 40 valku, mis paiknesid AIRE-ga samas kompleksis (Abramson *et al.*, 2010; Gaetani *et al.*, 2012). Kokku valiti töö jaoks välja

12 AIRE-ga interakteeruvat valku, nende hulgas BRD4, PARP1, DNA-PK, Ku70, Ku80 ja TOP2A, mille roll AIRE poolt vahendatud transkriptsiooni toimumisel on varasemalt kindlaks tehtud (Liiv *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2015; Bansal *et al.*, 2017; Guha *et al.*, 2017). Viidatud töödes on kasutatud muid geeniekspressiooni vaigistamise meetodeid ja leitud, et nende valkude vaigistamisel langeb ka AIRE poolt vahendatud transkriptsiooni aktivatsioon. Seega selle töö kontekstis käituskid mainitud valgud geenivaigistamise positiivsete kontrollidena. Osad sihtmärgid olid valitud sellised, mille seost AIRE funktsiooniga on vähe või üldse mitte uuritud. Nendeks sihtmärkideks olid TOP2B, KAP1, RuvBL1, RuvBL2, RANBP2 ja LMNB1 (Abramson *et al.*, 2010; Gaetani *et al.*, 2012). Eelnevalt loodud pX330-EGFP võimaldas suhteliselt lihtsalt sisestada gRNA järjestused enda koosseisu ja kontrollida kloneerimise efektiivsust restriksiooni reaktsiooniga. Kuna nii gRNA kui ka EGFP transkriptsioon algasid samalt U6 promootorilt, oli EGFP signaali alusel võimalik hinnata mõlema produkti ekspressiooni signaali ning transfektsiooni efektiivsust, mis olid visuaalse hinnangu alusel alati väga kõrged (joonis 5B). Need vaatlused võimaldasid jätkata CRISPR/Cas9 meetodiga, et uurida AIRE interaktsioonipartnerite ekspressiooni vaigistamise mõju AIRE poolt reguleeritud transkriptsioonile.

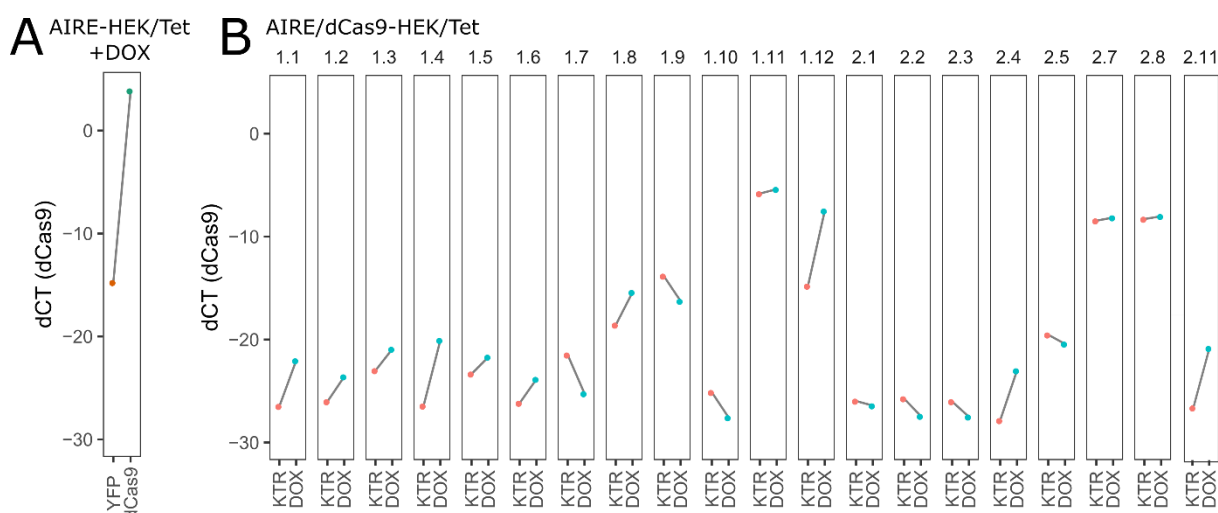
### 2.3.2 dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemine

dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva rakuliini tegemiseks kotransfektsiooni AIRE-HEK/Tet rakuliini kaks plasmidi, millest esimene sisaldas puromütsiini resistentsusgeeni kontrollimaks plasmiidide genoomi integreerumist ja teine kandis dCas9-KRAB liitvalku kodeerivat järjestust (Lisa 1). Kuna dCas9-KRAB valgu üleekspressioonil võivad olla raku elutegevust segavad kõrvalmõjud valiti katseteks plasmiid, milles oli dCas9-KRAB valgu ekspressioon doksütsükliinist sõltuva promootori kontrolli all. Joonisel 6 toodud katseskeemi alusel valiti välja 20 elujõulist rakukolooniat, mille puhul võis eeldada, et genoomi olid sisenenud nii selektsioonimarkerit kui ka dCas9-KRAB valku kodeerivad järjestused.



**Joonis 6. Klonaalse selektsiooni ajajoon.** Näidatud skeemi alusel valiti transfektsioonijärgselt välja kloonid, mis olid omandanud antibiootikumiresistentsuse ning eeldatavalt oma genoomi sisestanud ka dCas9-KRAB valku kodeeriva järjestuse.

Esmalt kontrolliti, et dCas9-KRAB tõepoolest ekspresseerub doksütsükliiniga indutseerimise järel, mõõtes qPCR-ga transientselt transfecteeritud rakkudes oleva dCas9-KRAB mRNA hulka. YFP (*yellow fluorescent protein*) transfectsioonikatsest mõõdeti transfectsioonijärgset dCas9 ekspressiooni mittespetsiifilist taustsignaali (joonis 7A). Selleks, et veenduda, kas dCas9-KRAB järjestus on AIRE-HEK/Tet rakkude genoomi integreerunud ja selle ekspressioon on doksütsükliiniga indutseeritav, sooritati kõigile 20 kolooniale samuti qPCR analüüs (Joonis 7B). Sealjuures arvestati eelnevalt tehtud YFP transfectsiooni järgset dCt väärtust kui taustsignaali.



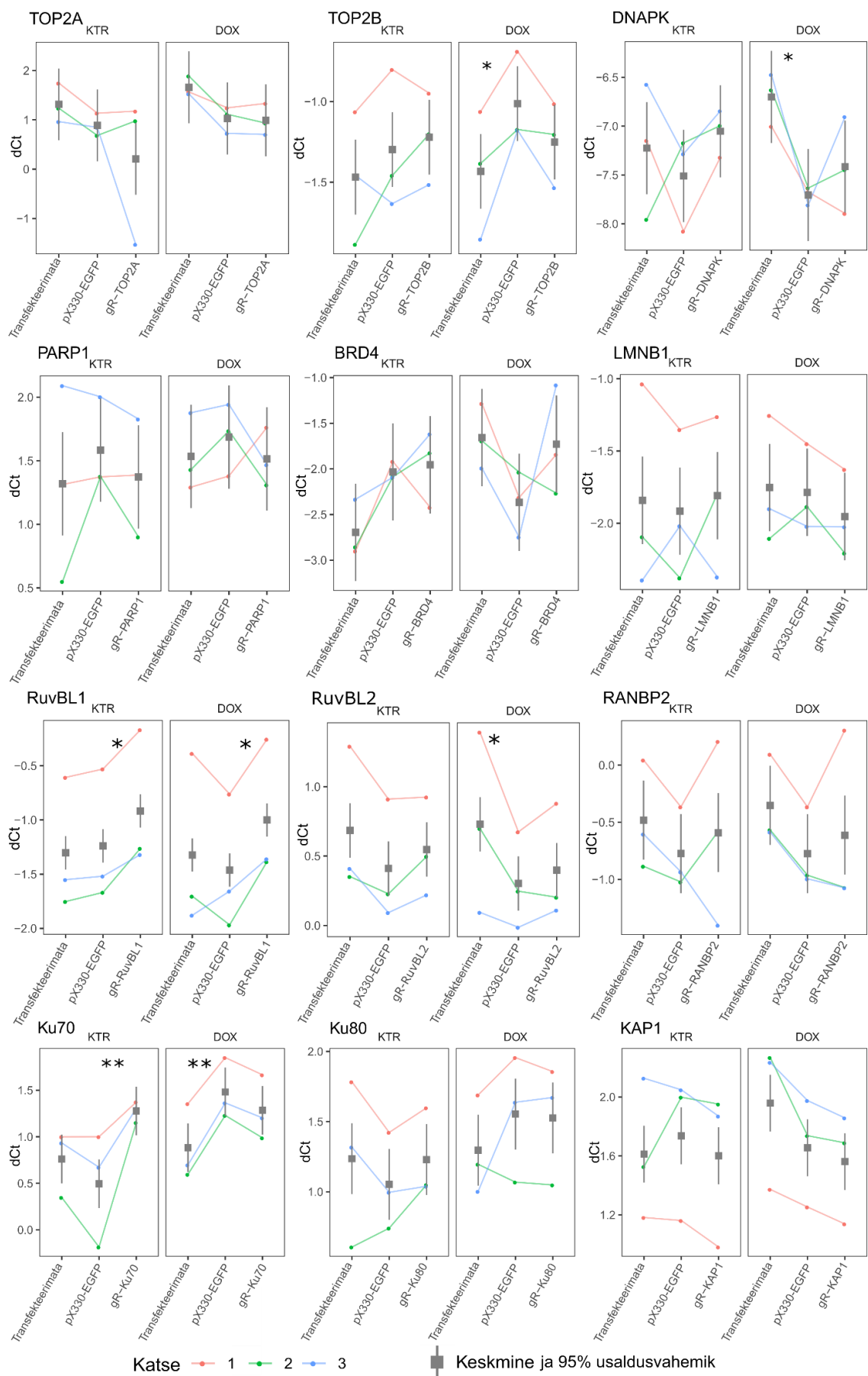
**Joonis 7. Klonaalsel selektsioonil saadud rakuliinide qPCR kontroll.** **A**, kontrollkatse hindamiseks dCas9-KRAB ekspressiooni dCas9-KRAB järjestusega plasmidi transfectsiooni järel AIRE-HEK/Tet rakkudes. YFP transfectsioonikatsest mõõdeti dCas9 ekspressiooni taustsignaali. Mõlemal puhul sooritati doksütsükliini induksioon. **B**, dCas9-KRAB ekspressiooni signaal klonaalse selektsiooniga saadud 20 rakukloonis nii doksütsükliiniga indutseerimata („KTR“) kui ka indutseeritud („DOX“) proovides. Kõiki proove töödeldi peale RNA puhastamist ka DNAasiga.

Antud qPCR tulemuste järgi oli kõrgeim dCas9-KRAB ekspressioon liinides HEK1.11, HEK1.12, HEK2.7 ning HEK2.8. Küll aga ei nähtud HEK1.11, HEK2.7 ning HEK2.8 liinides doksütsükliini poolt aktiveeritavat dCas9-KRAB geeniekspressiooni tõusu, vaid mõõdetud signaal oli samaväärne indutseerimata prooviga. See võib viidata sellele, et dCas9-KRAB järjestusega plasmidid olid genoomi sisenenud viisil, mis võimaldas geenil ekspresseeruda ka doksütsükliinist sõltumatult. Tasub märkida, et üheski kloonis ei olnud dCas9-KRAB ekspressioonitase sama kõrge nagu transientse ekspressiooni korral. Antud liinidest oli kõige sobivam HEK1.12, mis ekspresseeris dCas9-KRAB valku ning mille puhul oli ka näha selget

doksütsükliini indutseerivat efekti. Tulemuste õigsust kinnitab ka proovidest puhastatud RNA-ga sooritatud kontroll-qPCR, millelt dCas9-KRAB ekspressiooni ei tuvastatud (tulemusi ei ole esitatud). See näitab, et proovidele tehtud DNAasi töötlus oli olnud efektiivne ning välistab võimaluse, et dCas9-KRAB signaal rakuliinides tuvastati plasmiidse DNA kontaminatsiooni tõttu.

### **2.3.3 gRNA-de vahendatud AIRE-partnervalkude *knockdown* dCas9-KRAB liitvalku ekspresseerivas HEK1.12 rakuliinis**

Klonaalse selektsiooniga jõuti rakuliinini HEK1.12, mis ekspresseeris dCas9-KRAB liitvalku ning mille ekspressioon oli doksütsükliini kontrolli all. Järgmisena jätkati HEK1.12 rakuliinis AIRE partnervalkude geenide ekspressiooni vaigistamisega, võttes kasutusele eelnevalt mainitud 12 geeni vastu disainitud gRNA-d. Joonisel 8 on näha, et mitme gRNA sihtmärgi ekspressiooni mõjutas statistiliselt olulisel määral transfektsioon negatiivse kontrollina kasutatud pX330-EGFP plasmiidiga, mis ei sisalda ühtegi gRNA järjestust, võrreldes transfekkeerimata rakkudega. Need muutused ei olnud kindla suunaga ega sõltunud ka doksütsükliiniga indutseerimisest (vt *TOP2A* DOX ja *DNA-PK* DOX), mistõttu võis eeldada, et selles katses on mõõdetud juhuslikke ekspressioonitaseme kõikumisi. Lisaks sellele polnud ühelgi juhul võimalik tuvastada geeniekspressiooni vaigistamist gRNA-dega transfekkeerimise järel, kusjuures mõnel juhul esines hoopis ekspressioonitaseme tõus (vt *RuvBL1* või *Ku70* KTR). Kuna gRNA ja dCas9-KRAB koostoimel ei ole aktiveerivat toimet, siis võis taaskord oletada, et mõju avaldab lihtsalt plasmiidse DNA viimine rakkudesse ning dCas9-KRAB ekspressioon puudub.

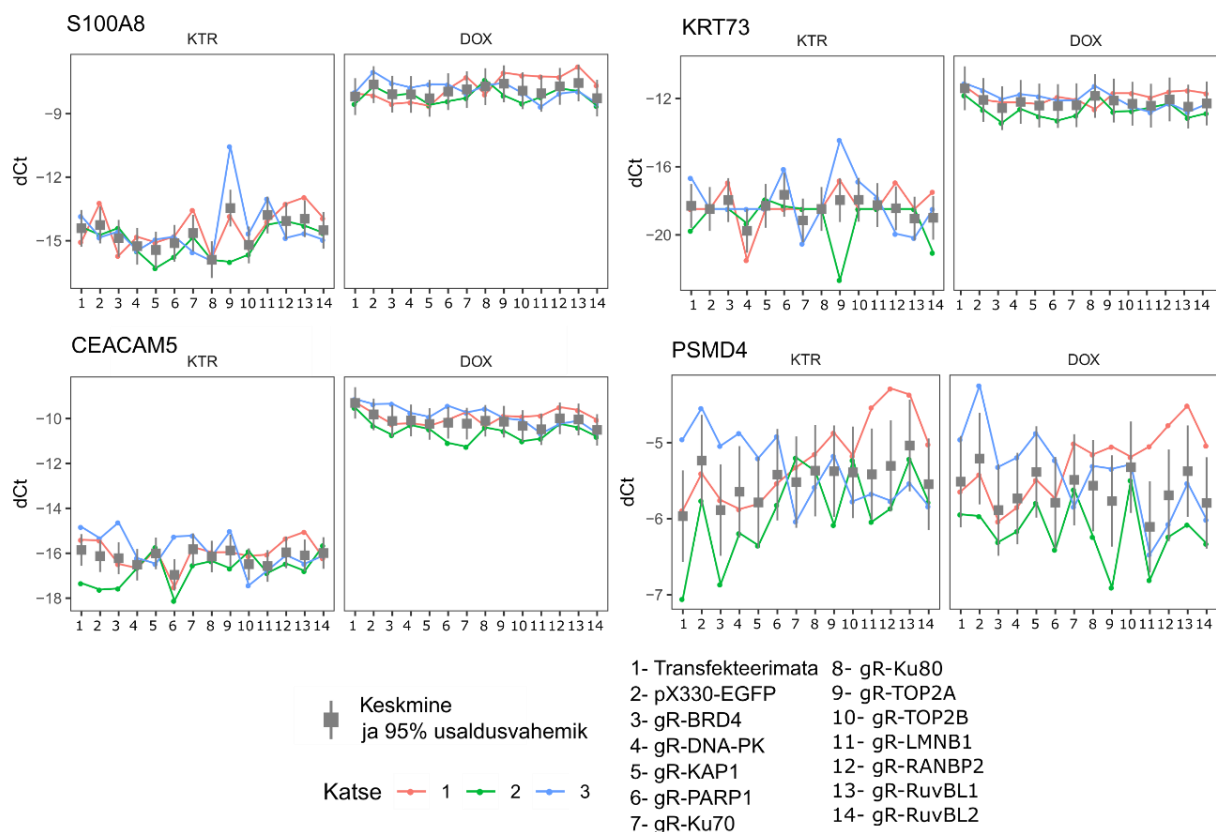


**Joonis 8. AIRE partnervalkude *knockdown* HEK1.12 rakuliinis.** dCas9-KRAB liitvalku ekspresseerivat HEK1.12 rakuliini transfecteeriti gRNA järjestusi sisaldavate plasmiididega,



mis olid disainitud *TOP2A*, *TOP2B*, *DNAPK*, *PARP1*, *BRD4*, *LMNB1*, *RuvBL1*, *RuvBL2*, *RANBP2*, *Ku70*, *Ku80* ja *KAP1* geenide vastu. Kontrollproovidenä olid kasutusel transfekterimata HEK1.12 rakud ning ilma gRNA järjestuseta pX330-EGFP plasmidi transfektsioon. Geeniekspressiooni taset analüüsiti qPCR meetodil. Tulemused on välja toodud nii doksütsükliiniga indutseerimata proovide („KTR“) kui ka indutseeritud proovide („DOX“) dCt väärtustena. Katse sooritati kolmes korduses. Joonistel on ära tähistatud statistiliselt olulised tulemused, sealjuures  $p < 0,05$  (\*) ja  $p < 0,01$  (\*\*).

Varasemalt avaldatud AIRE interaktsioonipartnerite uuringutest on ilmnenud, et enamiku partnervalkude *knockdown* põhjustab AIRE vahendatud geeniekspressiooni aktivatsiooni langust. LMNB1 valgu geeni alla reguleerimisel on aga nähtud AIRE sihtmärkgeenide ekspressiooni tõusu (Abramson *et al.*, 2010). AIRE-HEK/Tet rakuliinis on AIRE ekspressioon doksütsükliinist sõltuva promootori kontrolli all. Joonisel 9 kujutatud AIRE sihtmärkgeenide *S100A8*, *KRT73* ja *CEACAM5* ekspressioon tõusis aga doksütsükliiniga lisamise tagajärjel ning ekspressiooni kõikumises ei tuvastatud kontrollproovi suhtes statistiliselt olulist erinevust. Tasub märkida, et ilma AIRE juuresolekuta on madalal tasemel tugevalt kõikuv sihtmärkgeenide ekspressioon tihti esinev nähtus. Näiteks KRT73 geeniekspressioon jääb indutseerimata proovides tihti määramatuks. Ka selles katses on KRT73 geeni puhul kasutatud palju ennustatud keskmisi väärtusi. Katses mõõdeti veel AIRE-st sõltumatu *PSMD4* geeni ekspressiooni signaali, mis oli oodatult suhteliselt ühtlane üle kõikide katsetingimuste.



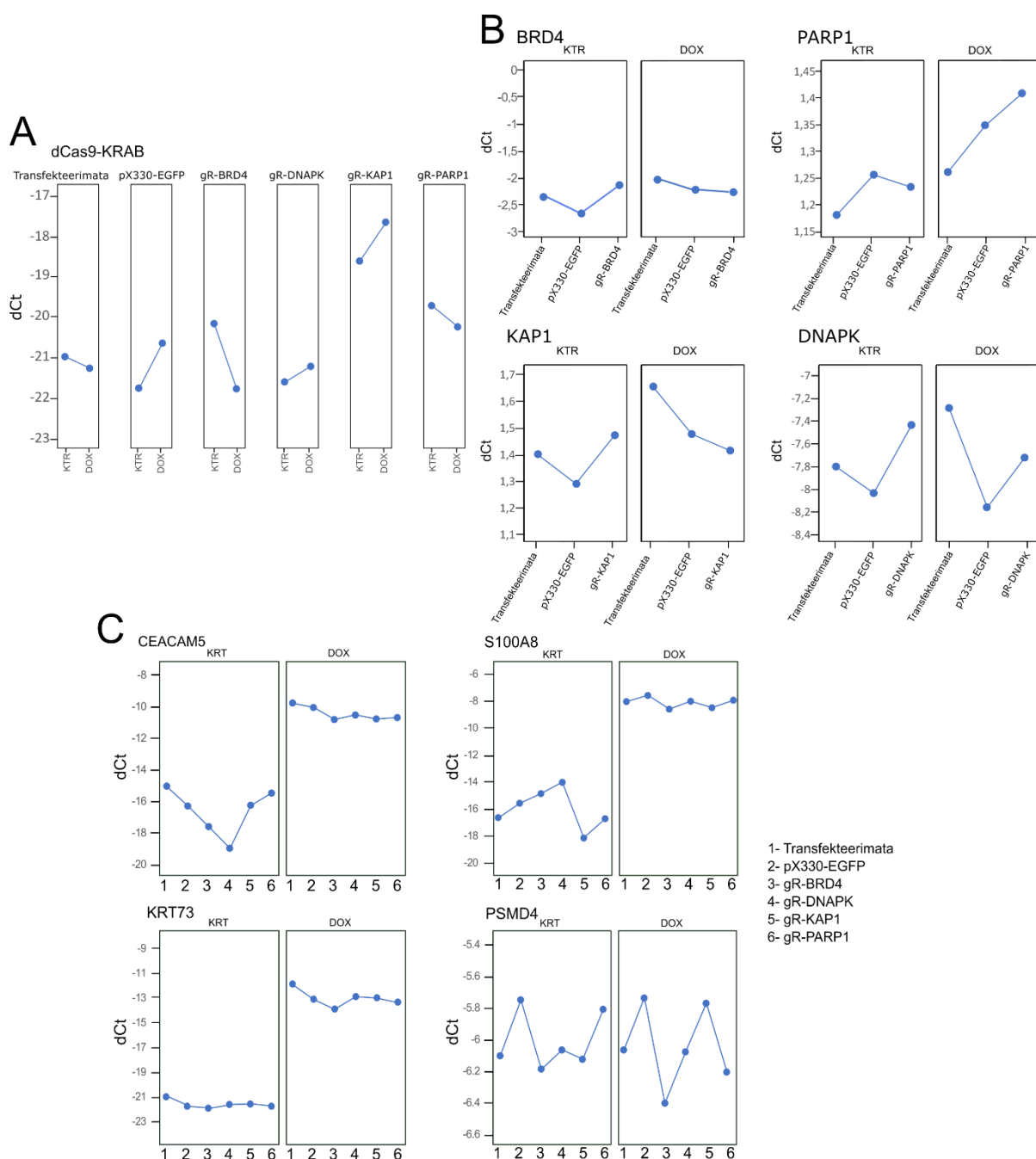
### Joonis 9. AIRE sihtmärkgeenide ekspressioon HEK1.12 rakuliini *knockdown* katses.

dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriva HEK1.12 rakuliiniga tehtud *knockdown* katsete qPCR analüüs valitud AIRE sihtmärkgeenidesle (*S100A8*, *KRT73*, *CEACAM5*) ning kontrollina AIRE-st sõltumatule geenile (*PSMD4*). Geeniekspressiooni taset mõõdeti nii doksütsükliiniga („KTR“) kui ka doksütsükliiniga („DOX“) indutseeritud proovides. Katse tehti kolmes korduses.

Kuna üheski HEK1.12 transfektsioonikatses ei ilmnenud CRISPR/dCas9 poolt vahendatud geeniekspressiooni vaigistavat toimet, tuli kontrollida, kas algselt selles rakuliinis nähtud dCas9 indutseeritavus on veel säilinud. Selleks kontrolliti esimesest korduskatsest pärit RNA proove dCas9 mRNA olemasolu suhtes, tehes neile eelnevalt DNAasi töötlus, et veenduda mõõdetud signaalide spetsiifilisuses.

DNaasi töötamise käigus veenduti, et HEK1.12 rakuliin on dCas9-KRAB ekspressiooni kaotanud (joonis 10A). Põhjuseks võivad olla nii mutatsioonid kui ka muutused kromatiini struktuuris, mis on viinud geeni vaigistamisele. Lisakontrolliks mõõdeti üle valitud gRNA sihtmärkide ning AIRE-sõltuvate geenide ja *PSMD4* ekspressiooni signaalid (joonis 10B ja C). Tulemused kinnitasid, et gRNA transfektsioonide järel ei esinenud *knockdown* efekti ja ka AIRE sihtmärkgeenide ekspressioon püsis doksütsükliini induktsiooni järel stabiilselt

kõrge ning ei olnud transfektsioonide poolt mõjutatud. Seega ei sobinud HEK1.12 rakuliin CRISPRi katseteks.

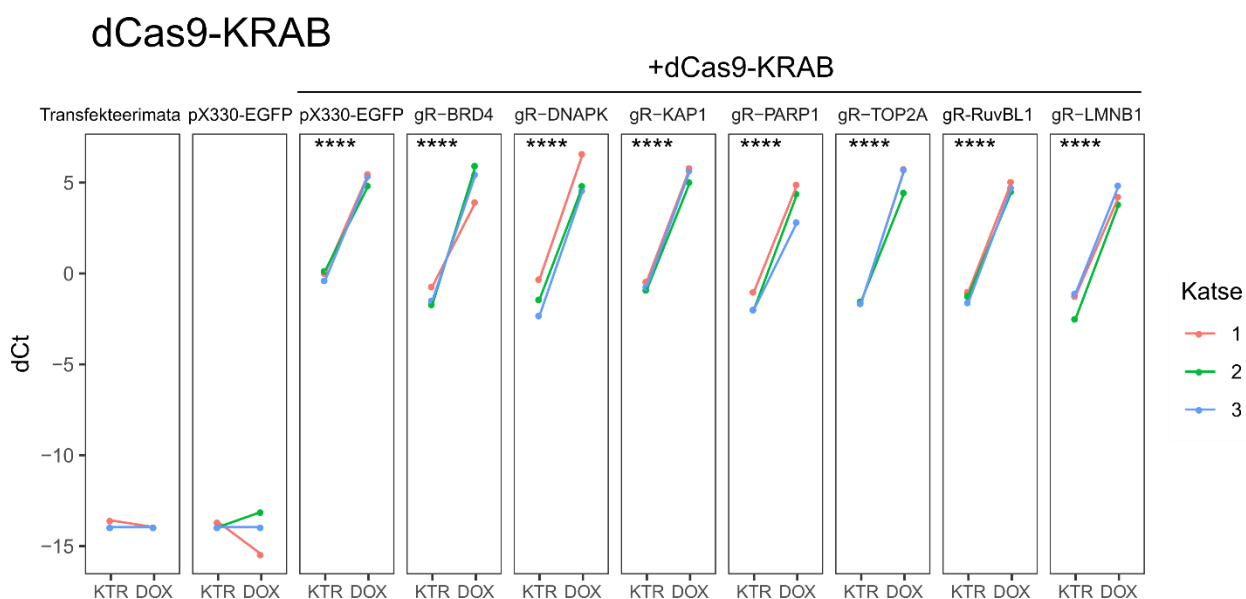


**Joonis 10. DNAasi töötamise järgne HEK1.12 rakuliinis tehtud *knockdown* katsete qPCR analüüs.** Analüüsiti esimesest korduskatsesest pärit *BRD4*, *PARP1*, *KAP1* ja *DNAPK* geenide *knockdown* proove. Geeniekspressiooni mõõdeti nii doksütsükliiniga indutseerimata („KTR“) kui indutseeritud („DOX“) proovides. **A**, dCas9-KRAB liitvalgu ekspressiooni HEK1.12 rakuliini *knockdown* katsetes kasutatud proovides. **B**, *BRD4*, *PARP1*, *KAP1* ja *DNAPK* geenide ekspressioon *knockdown* katsete proovides. **C**, AIRE sihtmärkgeenide (*CEACAM5*, *S100A8*, *KRT73*) ning AIRE-st sõltumatu geeni (*PSMD4*) ekspressioonitasemed *knockdown* katsete proovides.

### 2.3.4 AIRE-partnervalkude *knockdown* transientselt ekspresseerunud dCas9-KRAB liitvalguga

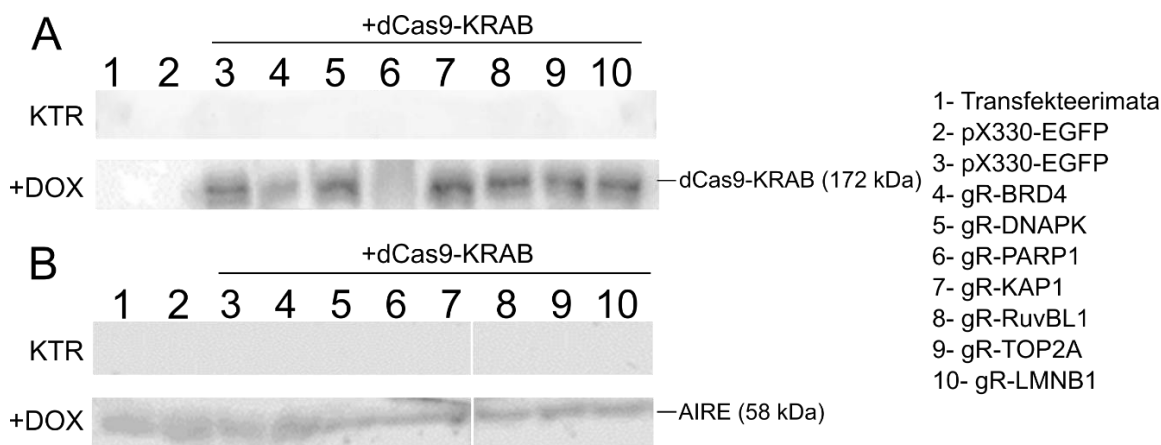
Kuna dCas9-KRAB valku ekspresseeriva rakuliini klonaalne selektsiooniga ei jõutud hea mudelsüsteemini, otsustati kasutada teisi meetodeid. Kloonide testimisel tuvastati eelnevalt kõrge dCas9-KRAB valgu ekspressioon kontrollproovis, kus dCas9-KRAB liitvalku kodeeriv järjestus asus pHAGE-TRE dCas9-KRAB plasmiidil (joonis 7A). Seega otsustati *knockdown* katseid jätkata transientselt ekspresseeruva dCas9-KRAB valguga.

Joonisel 11 kujutatud qPCR analüüsi tulemus AIRE-HEK/Tet rakuliinis transientselt ekspresseeritud dCas9-KRAB liitvalguga sooritatud *knockdown* katsetes näitas detekteeritavat dCas9-KRAB signaali nii doksütsükliiniga indutseeritud kui ka indutseerimata proovides. Küll aga tõusis dCas9-KRAB ekspressioon doksütsükliini lisamisel ligi 32 korda ning oli seega tugevalt indutseeritav. Indutseerimata proovidest mõõdetud dCas9-KRAB signaal võib tulla nii mittetäielikult õnnestunud DNAasi töötlustest kui ka Tet-On süsteemide puhul esinevast geeni taustekspressioonist. Igal juhul on transientselt ekspresseeritud dCas9-KRAB geeni tase kõrgem ning spetsiifilisem kui HEK1.12 rakuliini puhul.



**Joonis 11. Transientne dCas9-KRAB liitvalgu ekspressioon AIRE-HEK/Tet rakuliinis.** dCas9-KRAB geeniekspressiooni taset mõõdeti qPCR meetodil nii transfekteerimata, pX330-EGFP plasmiidiga transfekteeritud kui ka gRNA järjestustega plasmiididega proovides. Katse sooritati kolmes korduses ning geeniekspressiooni mõõdeti nii doksütsükliiniga indutseerimata („KTR“) kui ka indutseeritud („DOX“) proovides. „+dCas9-KRAB“ tähistab joonisel proove, mida oli transfekteeritud dCas9-KRAB valgu järjestust kandva plasmiidiga.

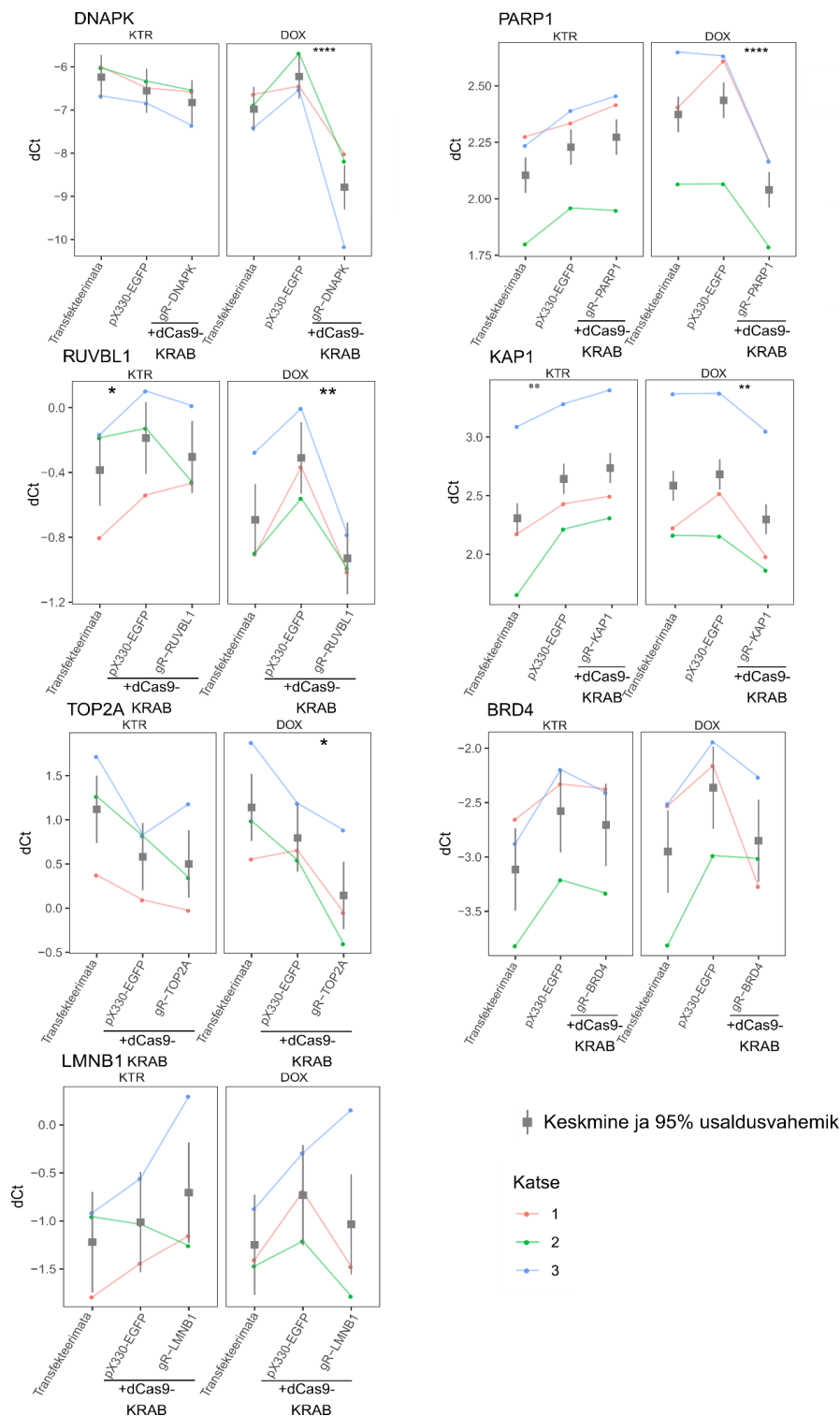
Transientselt ekspresseeritud dCas9-KRAB liitvalguga proovidele sooritati ka Western Blot analüüs, milles detekteeriti nii dCas9-KRAB kui ka AIRE valku. Joonisel 12 olevatel joonistel on kujutatud nii doksütsükliiniga kui ka doksütsükliiniga indutseeritud *knockdown* katse proovid. Kui joonisel 12A ei ole indutseerimata proovides dCas9-KRAB ekspressiooni valgu tasandil tuvastatud, siis doksütsükliini induktiooniga proovides on dCas9-KRAB selgelt detekteeritav. Seega ei pruugi ka qPCR analüüsiga indutseerimata proovides tuvastatud dCas9-KRAB valgu ekspressioonil olla valitud AIRE partnervalkude geenide ekspressioonile tugevat mõju. Joonisel 12B oleval joonisel on valgu tasemel selgelt näha, kuidas doksütsükliini lisamine aktiveerib AIRE ekspressiooni. Seega olid selles mudelsüsteemis ekspresseerunud nii dCas9-KRAB kui ka AIRE.



**Joonis 12. Western Blot analüüs dCas9-KRAB ja AIRE valgule transientselt ekspresseeruva dCas9-KRAB liitvalguga proovides.** Western Blot pildid dCas9-KRAB (A) ja AIRE (B) valgu ekspressioonist doksütsükliiniga indutseerimata („KTR“) ning indutseeritud („DOX“) proovides. Proovideks olid transfekteerimata ja ka pX330-EGFP plasmiidiga ja gRNA järjestusi kandvate plasmiididega transfekteeritud AIRE-HEK/Tet rakud. dCas9-KRAB järjestust kandev plasmiid oli transfekteeritud proovidesse 3-10.

AIRE partnervalkude *knockdown* katseid jätkati seitsme geeniga (joonis 13). Sõltumatute kontrollproovidena kasutati nii pX330-EGFP transfektsiooni (võrdlustes *DNAPK*, *PARP1*, *KAP1* ja *BRD4* spetsiifiliste gRNA transfektsioonidega) kui ka pX330-EGFP transfektsiooni koos dCas9-KRAB valgu kodeerivat järjestust kandva plasmiidiga (võrdlustes *RUVBL1*, *TOP2A*, *LMNB1* spetsiifiliste gRNA transfektsioonidega). Kummagi kontrolltransfektsiooni enda vahel statistiliselt olulist erinevust ei leitud (tulemust ei ole esitatud). Küll aga langes olulisel määral mitme AIRE interaktsioonipartneri mRNA ekspressioon peale gRNA-de

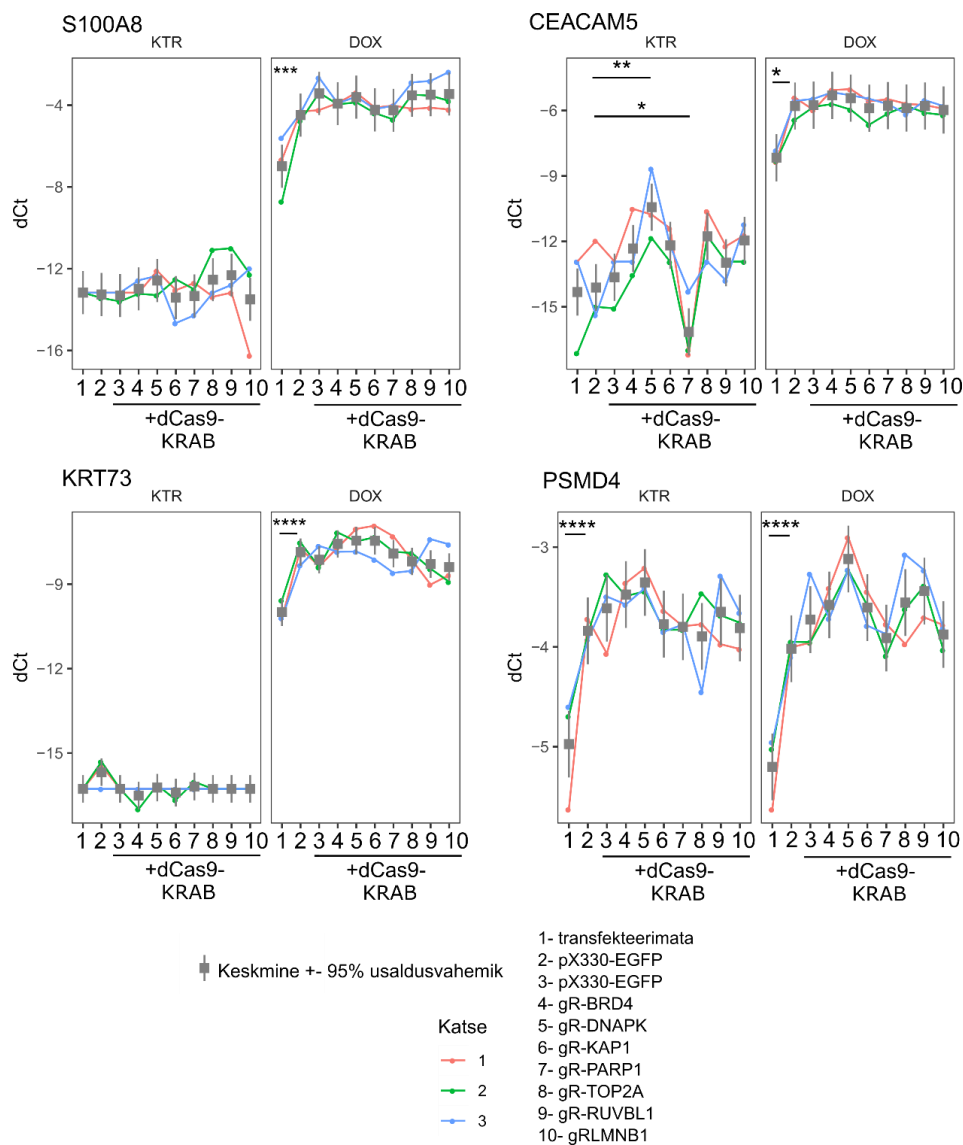
transfekterimist. See oli täheldatav nii DNAPK ja PARP1 ( $p < 0,0001$ ), RuvBL1 ja KAP1 ( $p < 0,01$ ) kui ka TOP2A puhul ( $p < 0,05$ ). BRD4 ja LMNB1 puhul statistiliselt olulist erinevust ei leitud, kuigi vastav trend oli täheldatav kahes katsekorduses kolmest. Katse näitas selgelt, et oli saavutatud piisav dCas9-KRAB ekspressioonitase valitud geenide allareguleerimiseks ning kinnitust sai ka efektiivselt funktsioneerivate gRNA-de valik.



**Joonis 13. AIRE partnervalkude ekspressioon transientselt ekspresseeritud dCas9-KRAB liitvalguga proovides. Transientselt ekspresseeritud dCas9-KRAB liitvalguga AIRE**

interaktsioonipartnerite geenide vaigistamist tehti seitsme geeniga: *DNAPK*, *PARP1*, *RuvBL1*, *KAP1*, *TOP2A*, *BRD4* ja *LMNB1*. Kontrollproovideks olid transfekteerimata ja pX330-EGFP plasmiidiga transfekteeritud AIRE-HEK/Tet rakud. qPCR analüüsiga saadud dCt väärtused on välja toodud nii doksütsükliiniga indutseerimata („KTR“) kui indutseeritud („DOX“) proovides. „+dCas9-KRAB“ tähistab proove, mida oli transfekteeritud ka dCas9-KRAB liitvalgu järjestust kandva plasmiidiga. Katse sooritati kolmes korduses. Joonisel on välja toodud statistiliselt olulised muutused, sealjuures  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Joonisel 14 on esitatud kolme AIRE sihtmärkgeeni ja AIRE-st sõltumatu PSMD4 geeni ekspressiooni doksütsükliiniga ning doksütsükliiniga proovides. Oodatult tõuseb märgatavalt kõigi AIRE-sõltuvate geenide tase peale doksütsükliini lisamist, kuid vaatamata sellele, et *DNAPK*, *PARP1*, *RUUBL1*, *KAP1* ning *TOP2A* ekspressioon õnnestus dCas9-KRAB valguga alla reguleerida, ei mõjutanud see AIRE võimet oma sihtmärkgeenide ekspressiooni aktiveerida. Selles katses on näha, et nii AIRE-sõltuvate kui ka PSMD4 geeni avaldumist stimuleerib transfektsioon plasmiidist või plasmiidide kombinatsioonist sõltumatult. Samas tundub vähetõenäoline, et see detekteeritud lisaaktivatsioon võiks peita AIRE partnervalkude vaigistamisest tuleneva mõju. Tuleb ära märkida, et *CEACAM5* ekspressiooni signaal siiski muutus statistiliselt oluliselt peale DNA-PK ja *PARP1* vaigistamist võrrelduna kontrolltransfektsiooniga, kuid seda ainult doksütsükliiniga indutseerimata proovides. Ilma AIRE aktiveeriva toimeta on *CEACAM5* ekspressioonitase väga madal, kõikides qPCR-i detektsiooni piiri peal, mistõttu võib oletada, et gRNA-de efekti asemel peegeldavad ekspressioonisignaali erinevused juhuslikke muutuseid.



**Joonis 14. AIRE sihtmärkgeenide ekspressioon transientselt ekspresseritud dCas9-KRAB liitvalguga proovides.** Joonisel on välja toodud qPCR analüüsist saadud dCt väärtused. Mõõdetud on AIRE sihtmärkgeenide (*S100A8*, *CEACAM5*, *KRT73*) ja AIRE-sõltumatu geeni *PSMD4* geeniekspressiooni taset. „+dCas9-KRAB“ tähistab proove, mida oli transfekeeritud ka dCas9-KRAB järjestust kandva plasmiidiga. Kontrollproovideks olid transfekeerimata ja pX330-EGFP plasmiidiga transfekeeritud AIRE-HEK/Tet rakud. Katset korraldati kolmes korduses. Välja on toodud statistiliselt olulised muutused, sealjuures  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Kokkuvõttes jõuti järeldusele, et antud katseskeem ei sobi AIRE ja tema interaktsioonipartnerite mõju uurimiseks AIRE poolt vahendatud geeniaktivatsiooni kontekstis. Kuigi dCas9-KRAB ja gRNA-de ekspressiooniplasmiidide transientse transfektsiooniga saavutati loodetud knockdown efekt, ei kajastunud see AIRE



sihtmärkgeenide aktivatsiooni muutustes. Tõenäoliselt oleks vaja lubada dCas9-KRAB valgul ja gRNA-del toimida pikemaajaliselt, kuid transientse transfektsiooni korral on seda raske kontrollida. AIRE valku kodeeriv järjestus on 1580 aluspaari pikkune (Heino et al., 1999), kuid dCas9-KRAB järjestus on 4461 aluspaari pikk (Kearns et al., 2014). Rakkudel võtab AIRE geeni transkribeerimine ligi 3x vähem aega kui dCas9-KRAB puhul. AIRE võib oma sihtmärkgeenide ekspressiooni aktiveerida enne kui partnervalkude ekspressiooni on jõutud alla reguleerida. Seega tuleks edasistes katsetes kasutada skeemi, mille puhul toimub esmalt AIRE partnervalkude knockdown ning AIRE ekspressioon aktiveeritakse ajaliselt hiljem. Seetõttu peaks eelistama lähenemist, mis tagaks dCas9-KRAB valgu stabiilse ekspressiooni, milleks on dCas9-KRAB kodeerivat järjestust sisaldava genoomiga rakuliin. Keeruliseks teeb lahenduse see, et dCas9-KRAB on võrdlemisi suur valk (172 kDa) ja võib üleekspressiooni tingimustes avaldada rakkudele toksilist mõju. HEK1.12 rakuliini ekspressioonianalüüsi põhjal on võimalik oletada, et genoomi integreerumise järel proovivad rakud dCas9-KRAB järjestust vaigistada. On näidatud, et selleks muteeritakse või remodelleeritakse kromatiini, mis kõrvaldavad raku elutegevuseks potentsiaalse stressiallika (Kaufman *et al.*, 2008). Selleks, et valgu hulka rakus kontrollida, tasub proovida dCas9-KRAB järjestuse ekspresseerimiseks plasmide, mille koostisesse kuulub suhteliselt nõrk promootorjärjestus. Lisaks tuleks edasistes katsetes klonaalses selektsioonis dCas9-KRAB valku kodeeriva plasmidi genoomi sisenemise kinnitamiseks selle järjestus genoomselt DNA-lt kontrolliks PCR meetodil üles amplifitseerida või ära sekveneerida.

AIRE ja tema interaktsioonipartnerite koostoime käivitab väga võimsa transkriptsiooni aktivatsiooni, mille alusmehhanismid vajavad jätkuvat tähelepanu. Selle nähtuse uurimise jaoks sobivate mudelsüsteemide väljatöötamine on osutunud raskeks väljakutseks, kuid tehtud töö põhjal on kaardistatud senise metoodika kitsaskohad ja leitud suunised efektiivsemate lähenemiste kasutuselevõtuks.

## KOKKUVÕTE

Selle töö eesmärgiks oli uurida võimalust vaigistada AIRE-ga interakteeruvate valkude avaldumist CRISPRi meetodil ja näha, millist efekti avaldab see AIRE sihtmärkgeenide ekspressioonile.

1. Selleks kloonitati valmis pX330-EGFP vektor, kuhu sisestati 12 AIRE partnergeenide vastu disainitud gRNA järjestused. Transfektsiooni efektiivsust hinnati EGFP signaali järgi, mis oli katsetes läbivalt kõrge.
2. Töös loodi ka dCas9-KRAB liitvalku ekspresseeriv HEK1.12 rakuliin, milles oli dCas9-KRAB ekspressioon doksütsükliini kontrolli all.
3. Kuigi klonaalse selektsiooni järel leiti, et liin HEK1.12 ekspresseerib dCas9-KRAB geeni, ei tuvastatud dCas9-KRAB ekspressiooni hilisemates knockdown katsetes. Seetõttu ei nähtud selle rakuliiniga ka AIRE partnervalgude geenide vaigistamise efekti. Tugeva vaigistamise efektini jõuti aga katsetes, kus kasutati transientset dCas9-KRAB ekspresseerimist vastavat järjestust kandvalt plasmiidilt.
4. Kuigi mitme geeni puhul suudeti ekspressiooni mitmekordselt maha suruda, ei avaldanud see mõju AIRE sihtmärkgeenide ekspressioonile.

## SUMMARY

The autoimmune regulator AIRE is known as a transcriptional regulator that functions by promoting transcription of thousands of tissue restricted antigens in medullary thymic epithelial cells (mTECs). Differentiating T cells that recognize these self antigens with high affinity are removed by apoptosis. This mechanism inhibits the migration of autoreactive T-cells into peripheral tissues and leads to an immunological state called immune tolerance. Mutations in *AIRE* cause autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS-1), also known as autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED).

To achieve its function, AIRE interacts with a number of partner proteins, many of which have been little studied in the context of AIRE. Therefore, the final mechanism by which AIRE initiates autoantigen expression in thymus remains unclear.

The aim of this work was to investigate the possibility of silencing the expression of AIRE-interacting proteins with CRISPR interference method to see the effect it exerts on the expression of AIRE target genes. For this purpose, a gRNA vector was cloned, where gRNA sequences designed against a selection of AIRE partner genes were inserted. The efficiency of transfection was assessed by EGFP signal, which was high throughout the experiments. In this work, a cell line, HEK1.12, expressing dCas9-KRAB was also developed, where the expression of dCas9-KRAB was under the control of a doxycycline inducible promoter. Although clonal selection indicated that the HEK1.12 cell line expresses dCas9-KRAB, the expression of dCas9-KRAB was not detected in subsequent knockdown experiments. Therefore, no knockdown effect of AIRE interaction partner genes using the HEK1.12 cell line was observed. However, a strong knockdown effect was achieved in experiments, where dCas9-KRAB was expressed transiently from a plasmid bearing the corresponding sequence. Although the *knockdown* of many genes of interest was observed, it did not affect the expression of AIRE target genes.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C. and Mathis, D. (2010) 'Aire's Partners in the Molecular Control of Immunological Tolerance', *Cell*. Cell Press, 140(1), pp. 123–135.
- Aird, E. J., Lovendahl, K. N., St. Martin, A., Harris, R. S. and Gordon, W. R. (2018) 'Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template', *Communications Biology*. Nature Publishing Group, 1(1), p. 54
- Anderson, M. S., Venzani, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. and Mathis, D. (2002) 'Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 298(5597), pp. 1395–401
- Arslan, Z., Wurm, R., Brener, O., Ellinger, P., Nagel-Steger, L., Oesterhelt, F., Schmitt, L., Willbold, D., Wagner, R., Gohlke, H., Smits, S. H. J. and Pul, Ü. (2013) 'Double-strand DNA end-binding and sliding of the toroidal CRISPR-associated protein Csn2', *Nucleic Acids Research*, 41(12), pp. 6347–6359.
- Bansal, K., Yoshida, H., Benoist, C. and Mathis, D. (2017) 'The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers', *Nature Immunology*, 18(3), pp. 263–273.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709–1712.
- Bjorses, P., Pelto-Huikko, M., Kaukonen, J., Aaltonen, J., Peltonen, L. and Ulmanen, I. (1999) 'Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures', *Human Molecular Genetics*, 8(2), pp. 259–266.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) 'Pathways of Antigen Processing', *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp. 443–473.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S. D. (2005) 'Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin', *Microbiology*, 151(8), pp. 2551–2561.
- Capecchi, M. R. (1989) 'Altering the genome by homologous recombination.', *Science (New York, N.Y.)*, 244(4910), pp. 1288–92.
- Cheng, A. W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T. W., Rangarajan, S.,

- Shivalila, C. S., Dadon, D. B. and Jaenisch, R. (2013) 'Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system.', *Cell research*. Nature Publishing Group, 23(10), pp. 1163–71.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. and Kim, J.-S. (2013) 'Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 31(3), pp. 230–232.
- Danan-Gotthold, M., Guyon, C., Giraud, M., Levanon, E. Y. and Abramson, J. (2016) 'Extensive RNA editing and splicing increase immune self-representation diversity in medullary thymic epithelial cells.', *Genome biology*. BioMed Central, 17(1), p. 219.
- Das, A. T., Tenenbaum, L. and Berkhout, B. (2016) 'Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression', *Current Gene Therapy*. Bentham Science Publishers, 16(3), p. 156.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. and Charpentier, E. (2011) 'CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.', *Nature*. Europe PMC Funders, 471(7340), pp. 602–7.
- Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K. and Kyewski, B. (2008) 'Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(2), pp. 657–62.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. and Klein, L. (2001) 'Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self', *Nature Immunology*, 2(11), pp. 1032–1039.
- Dobbs, T. A., Tainer, J. A. and Lees-Miller, S. P. (2010) 'A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation', *DNA Repair*. Elsevier, 9(12), pp. 1307–1314.
- Dominguez, A. A., Lim, W. A. and Qi, L. S. (2016) 'Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), pp. 5–15.
- Eldershaw, S. A., Sansom, D. M. and Narendran, P. (2011) 'Expression and function of the autoimmune regulator (Aire) gene in non-thymic tissue', *Clinical & Experimental Immunology*, 163(3), pp. 296–308.
- Gaetani, M., Matafora, V., Saare, M., Spiliotopoulos, D., Mollica, L., Quilici, G., Chignola,

- F., Mannella, V., Zucchelli, C., Peterson, P., Bachi, A. and Musco, G. (2012a) 'AIRE-PHD fingers are structural hubs to maintain the integrity of chromatin-associated interactome.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 40(22), pp. 11756–68.
- Gaetani, M., Matafora, V., Saare, M., Spiliotopoulos, D., Mollica, L., Quilici, G., Chignola, F., Mannella, V., Zucchelli, C., Peterson, P., Bachi, A. and Musco, G. (2012b) 'AIRE-PHD fingers are structural hubs to maintain the integrity of chromatin-associated interactome.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 40(22), pp. 11756–68.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. and Moineau, S. (2010) 'The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA', *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7320), pp. 67–71.
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H. L., Bassik, M. C., Qi, L. S., Kampmann, M. and Weissman, J. S. (2014) 'Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation.', *Cell*. NIH Public Access, 159(3), pp. 647–61.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S. and Qi, L. S. (2013) 'CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.', *Cell*. NIH Public Access, 154(2), pp. 442–51.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) 'Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 89(12), p. 5547.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995) 'Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.', *Science (New York, N.Y.)*, 268(5218), pp. 1766–9.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenhausen, M. and Kyewski, B. (2004) 'Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters', *The Journal of Experimental Medicine*, 199(2), pp. 155–166.
- Guha, M., Saare, M., Maslovskaja, J., Kisand, K., Liiv, I., Haljasorg, U., Tasa, T., Metspalu, A., Milani, L. and Peterson, P. (2017) 'DNA breaks and chromatin structural changes enhance the transcription of autoimmune regulator target genes', *Journal of Biological Chemistry*, 292(16), pp. 6542–6554.

- Heessen, S. and Fornerod, M. (2007) 'The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place', *EMBO reports*. EMBO Press, 8(10), pp. 914–919.
- Hefferin, M. L. and Tomkinson, A. E. (2005) 'Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining', *DNA Repair*, 4(6), pp. 639–648.
- Heler, R., Samai, P., Modell, J. W., Weiner, C., Goldberg, G. W., Bikard, D. and Marraffini, L. A. (2015) 'Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation', *Nature*, 519(7542), pp. 199–202.
- Hillen, W. and Berens, C. (1994) 'Mechanisms Underlying Expression of TN10 Encoded Tetracycline Resistance', *Annual Review of Microbiology*, 48(1), pp. 345–369.
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E. and Gersbach, C. A. (2015) 'Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers.', *Nature biotechnology*. NIH Public Access, 33(5), pp. 510–7.
- Hooton, S. P. T. and Connerton, I. F. (2015) 'Campylobacter jejuni acquire new host-derived CRISPR spacers when in association with bacteriophages harboring a CRISPR-like Cas4 protein', *Frontiers in Microbiology*, 5, p. 744.
- Huang, F., Shao, W., Fujinaga, K. and Peterlin, B. M. (2018) 'Bromodomain-containing protein 4-independent transcriptional activation by autoimmune regulator (AIRE) and NF- $\kappa$ B.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 293(14), pp. 4993–5004.
- Huo, Y., Nam, K. H., Ding, F., Lee, H., Wu, L., Xiao, Y., Farchione, M. D., Zhou, S., Rajashankar, K., Kurinov, I., Zhang, R. and Ke, A. (2014) 'Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(9), pp. 771–777.
- Husebye, E. S., Perheentupa, J., Rautemaa, R. and Kämpe, O. (2009) 'Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I', *Journal of Internal Medicine*, 265(5), pp. 514–529.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987) 'Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 169(12), pp. 5429–33.

- Jackson, S. P. (2002) 'Sensing and repairing DNA double-strand breaks.', *Carcinogenesis*, 23(5), pp. 687–96.
- Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W. and Schouls, L. M. (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.', *Molecular microbiology*, 43(6), pp. 1565–75.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821.
- Ju, B.-G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2006) 'A Topoisomerase II $\beta$ -Mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 312(5781), pp. 1798–1802.
- Karvelis, T., Gasiunas, G., Miksys, A., Barrangou, R., Horvath, P. and Siksnys, V. (2013) 'crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*', *RNA Biology*. Taylor & Francis, 10(5), p. 841.
- Kaufman, W. L., Kocman, I., Agrawal, V., Rahn, H.-P., Besser, D. and Gossen, M. (2008) 'Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 36(17), p. e111.
- Kearns, N. A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R. M., Silverstein, N. J., Garber, M. and Maehr, R. (2015) 'Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion.', *Nature methods*. NIH Public Access, 12(5), pp. 401–403.
- Kent, W., Sugnet, C., Furey, T., Roskin, K., Pringle, T., Zahler, A. and Haussler, D. (2002) 'The human genome browser at UCSC.', *Genome research*, 12(6), pp. 996–1006.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A. S., Podkrajšek, K. T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M. M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K. J. E., Pura, M., Schalke, B., Ströbel, P., Leite, M. I., Battelino, T., Husebye, E. S., Peterson, P., Willcox, N. and Meager, A. (2010) 'Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), pp. 299–308.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. and Kyewski, B. (2009) 'Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction', *Nature Reviews*



*Immunology*, 9(12), pp. 833–844.

Koh, A. S., Miller, E. L., Buenrostro, J. D., Moskowitz, D. M., Wang, J., Greenleaf, W. J., Chang, H. Y. and Crabtree, G. R. (2018) ‘Rapid chromatin repression by Aire provides precise control of immune tolerance’, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 19(2), pp. 162–172.

Kosicki, M., Tomberg, K. and Bradley, A. (2018) ‘Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements’, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 36(8), p. 765.

Kurd, N. and Robey, E. A. (2016) ‘T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective.’, *Immunological reviews*. NIH Public Access, 271(1), pp. 114–26.

Kurts, C., Robinson, B. W. S. and Knolle, P. A. (2010) ‘Cross-priming in health and disease’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(6), pp. 403–414.

Liiv, I., Haljasorg, U., Kisand, K., Maslovskaja, J., Laan, M. and Peterson, P. (2012) ‘AIRE-induced apoptosis is associated with nuclear translocation of stress sensor protein GAPDH’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 423(1), pp. 32–37.

Liiv, I., Rebane, A., Org, T., Saare, M., Maslovskaja, J., Kisand, K., Juronen, E., Valmu, L., Bottomley, M. J., Kalkkinen, N. and Peterson, P. (2008) ‘DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: Importance in transcriptional activity’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1783(1), pp. 74–83.

Lupo, A., Cesaro, E., Montano, G., Zurlo, D., Izzo, P. and Costanzo, P. (2013) ‘KRAB-Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions.’, *Current genomics*. Bentham Science Publishers, 14(4), pp. 268–78.

Makarova, K. S., Anantharaman, V., Grishin, N. V., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2014) ‘CARF and WYL domains: ligand-binding regulators of prokaryotic defense systems’, *Frontiers in Genetics*, 5, p. 102

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V. (2006) ‘A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action.’, *Biology direct*. BioMed Central, 1, p. 7.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica,

- F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., Oost, J. van der, Backofen, R. and Koonin, E. V. (2015) 'An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems', *Nature reviews. Microbiology*. NIH Public Access, 13(11), p. 722.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013) 'RNA-guided human genome engineering via Cas9.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 339(6121), pp. 823–6.
- McCaughy, T. M., Wilken, M. S. and Hogquist, K. A. (2007) 'Thymic emigration revisited', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(11), pp. 2513–2520.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Almendros, C. (2009) 'Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system', *Microbiology*. Microbiology Society, 155(3), pp. 733–740.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E. (2005) 'Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J. E., Lalioti, M. D., Mullis, P. E., Antonarakis, S. E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F. and Shimizu, N. (1997) 'Positional cloning of the APECED gene', *Nature Genetics*, 17(4), pp. 393–398.
- Núñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V, Davies, C. W. and Doudna, J. A. (2014) 'Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity', *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(6), pp. 528–534.
- Oftedal, B. E., Hellesen, A., Erichsen, M. M., Bratland, E., Vardi, A., Perheentupa, J., Kemp, E. H., Fiskerstrand, T., Viken, M. K., Weetman, A. P., Fleishman, S. J., Banka, S., Newman, W. G., Sewell, W. A. C., Sozaeva, L. S., Zayats, T., Haugarvoll, K., Orlova, E. M., Haavik, J., Johansson, S., Knappskog, P. M., Løvås, K., Wolff, A. S. B., Abramson, J. and Husebye, E. S. (2015) 'Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases', *Immunity*, 42(6), pp. 1185–1196.
- Org, T., Chignola, F., Hetényi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., Maran, U., Mollica, L., Bottomley, M. J., Musco, G. and Peterson, P. (2008) 'The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression', *EMBO reports*, 9(4), pp. 370–376.

- Org, T., Rebane, A., Kisand, K., Laan, M., Haljasorg, U., Andreson, R. and Peterson, P. (2009) 'AIRE activated tissue specific genes have histone modifications associated with inactive chromatin.', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 18(24), pp. 4699–710.
- Orlova, E. M., Bukina, A. M., Kuznetsova, E. S., Kareva, M. A., Zakharova, E. U., Peterkova, V. A. and Dedov, I. I. (2010) 'Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1 in Russian Patients: Clinical Variants and Autoimmune Regulator Mutations', *Hormone Research in Paediatrics*, 73(6), pp. 449–457.
- Oven, I., Brdickova, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M. and Peterlin, B. M. (2007) 'AIRE Recruits P-TEFb for Transcriptional Elongation of Target Genes in Medullary Thymic Epithelial Cells', *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), pp. 8815–8823.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., Thakore, P. I., Glass, K. A., Ousterout, D. G., Leong, K. W., Guilak, F., Crawford, G. E., Reddy, T. E. and Gersbach, C. A. (2013) 'RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors.', *Nature methods*. NIH Public Access, 10(10), pp. 973–6.
- Perniola, R. and Musco, G. (2014) 'The biophysical and biochemical properties of the autoimmune regulator (AIRE) protein', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1842(2), pp. 326–337.
- Pinto, S., Michel, C., Schmidt-Glenewinkel, H., Harder, N., Rohr, K., Wild, S., Brors, B. and Kyewski, B. (2013) 'Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(37), pp. E3497–505.
- Plevin, M. J., Mills, M. M. and Ikura, M. (2005) 'The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends, 30(2), pp. 66–69.
- Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., Al-Muhsen, S., Al-Owain, M., Arkwright, P. D., Costigan, C., McConnell, V., Cant, A. J., Abinun, M., Polak, M., Bougnères, P.-F., Kumararatne, D., Marodi, L., Nahum, A., Roifman, C., Blanche, S., Fischer, A., Bodemer, C., Abel, L., Lilic, D. and Casanova, J.-L. (2010) 'Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and

- autoimmune polyendocrine syndrome type I', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), pp. 291–297.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. and Lim, W. A. (2013) 'Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression.', *Cell*. NIH Public Access, 152(5), pp. 1173–83.
- Samai, P., Pyenson, N., Jiang, W., Goldberg, G. W., Hatoum-Aslan, A. and Marraffini, L. A. (2015) 'Co-transcriptional DNA and RNA Cleavage during Type III CRISPR-Cas Immunity', *Cell*, 161(5), pp. 1164–1174.
- Sansom, S. N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I. C., Deadman, M. E., Heger, A., Ponting, C. P. and Holländer, G. A. (2014) 'Population and single-cell genomics reveal the *Aire* dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia', *Genome Research*, 24(12), pp. 1918–1931.
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. and Siksnys, V. (2011) 'The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 39(21), pp. 9275–82.
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., Rauscher, F. J. and III (2002) 'SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(8), pp. 919–32.
- Schultz, D. C., Friedman, J. R., Rauscher, F. J. and III (2001) 'Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(4), pp. 428–43.
- Schwartz, R. H. (2012) 'Historical overview of immunological tolerance.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(4), p. a006908.
- Smith, G. C. and Jackson, S. P. (1999) 'The DNA-dependent protein kinase.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13(8), pp. 916–34.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) 'Positive and Negative Selection of T Cells', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 21(1), pp. 139–176.

- Tao, Y., Kupfer, R., Stewart, B. J., Williams-Skipp, C., Crowell, C. K., Patel, D. D., Sain, S. and Scheinman, R. I. (2006) 'AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix', *Molecular Immunology*, 43(4), pp.
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E. and Gersbach, C. A. (2015) 'Highly Specific Epigenome Editing by CRISPR/Cas9 Repressors for Silencing of Distal Regulatory Elements', *Nature methods*. NIH Public Access, 12(12), p. 1143.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1997) 'The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function', *Nature*. Nature Publishing Group, 387(6634), pp. 677–684.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000) 'Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(14), pp. 7963–8.
- Wang, R., Preamplume, G., Terns, M. P., Terns, R. M. and Li, H. (2011) 'Interaction of the Cas6 Riboendonuclease with CRISPR RNAs: Recognition and Cleavage', *Structure*, 19(2), pp. 257–264.
- Waterfield, M., Khan, I. S., Cortez, J. T., Fan, U., Metzger, T., Greer, A., Fasano, K., Martinez-Llordella, M., Pollack, J. L., Erle, D. J., Su, M. and Anderson, M. S. (2014) 'The transcriptional regulator Aire coopts the repressive ATF7ip-MBD1 complex for the induction of immunotolerance.', *Nature immunology*. NIH Public Access, 15(3), pp. 258–65.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N. S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D. G., Zhang, F., Anderson, D. G., Sharp, P. A. and Jacks, T. (2014) 'CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver', *Nature*. Nature Publishing Group, 514(7522), pp. 380–384.
- Yoshida, H., Bansal, K., Schaefer, U., Chapman, T., Rioja, I., Proekt, I., Anderson, M. S., Prinjha, R. K., Tarakhovsky, A., Benoist, C. and Mathis, D. (2015) 'Brd4 bridges the transcriptional regulators, Aire and P-TEFb, to promote elongation of peripheral-tissue antigen transcripts in thymic stromal cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(32), pp. E4448–57.

**Kasutatud veebiaadressid:**

(<https://www.addgene.org/crispr/history/>)

## **Tänuõnad**

Sooviksin südamest tänada oma armsa molekulaarpatoloogia uurimisrühma kõiki liikmeid, kes olid töö valmimisel alati abiks. Koosveedetud aeg andis palju jõudu ja oli suureks motivatsiooniks. Siinkohal tänan ka Pärt Petersoni võimaluse eest uurimisrühmaga liituda.

Eraldi soovin tänada oma juhendaja Mariot, kellega koos töötamine oli suurim rõõm. Tänu pidevale positiivsele ja toetavale hoiakule (ka tuhande kilomeetri tagant) püsisid ka pingelisematel aegadel tuju hea ja motivatsioon kõrge.

## LISAD

**Lisa 1.** Töös kasutatud plasmiidide kaardid.

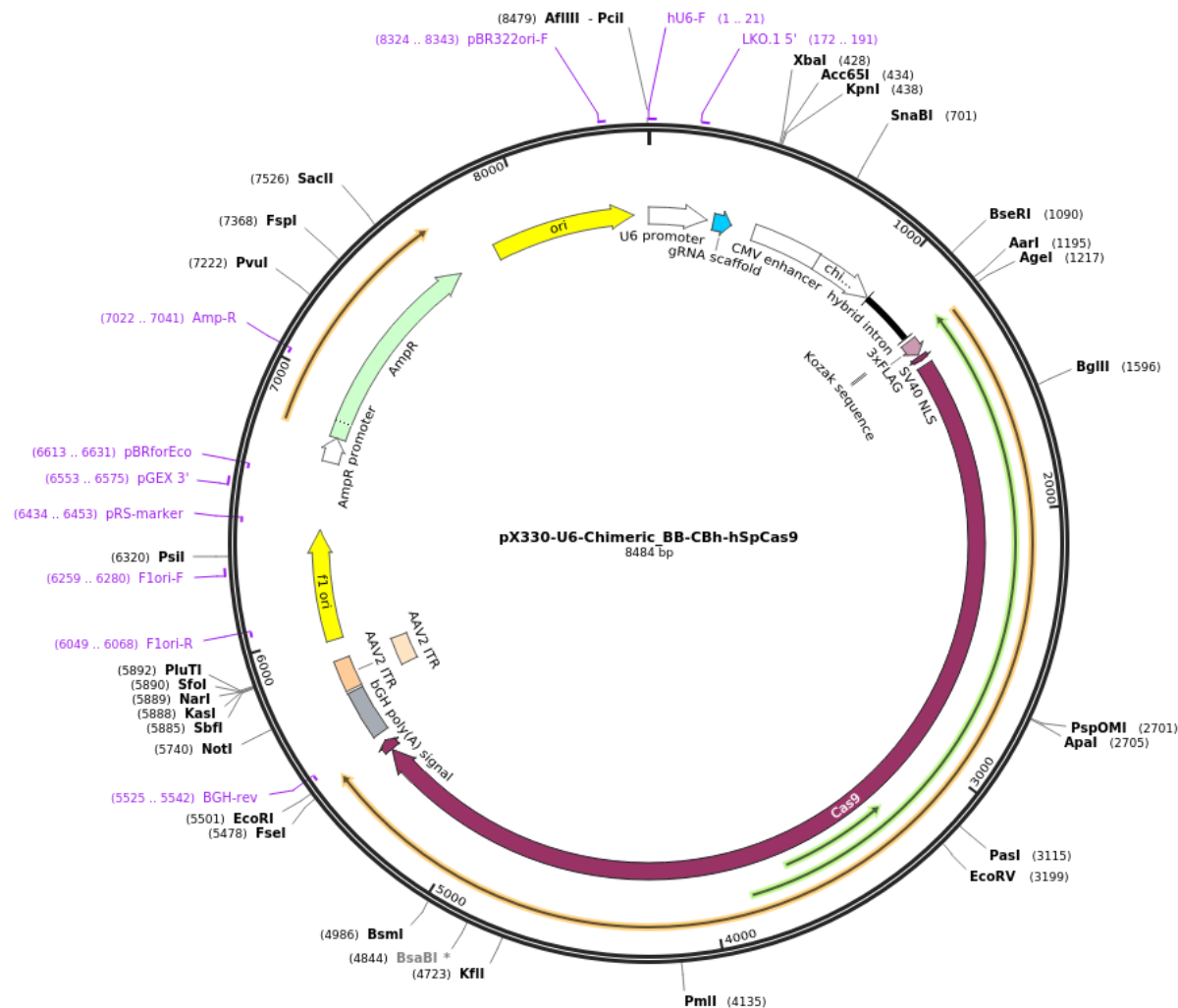
### Lisa 1.1 pHAGE TRE dCas9-KRAB

Created with SnapGene®



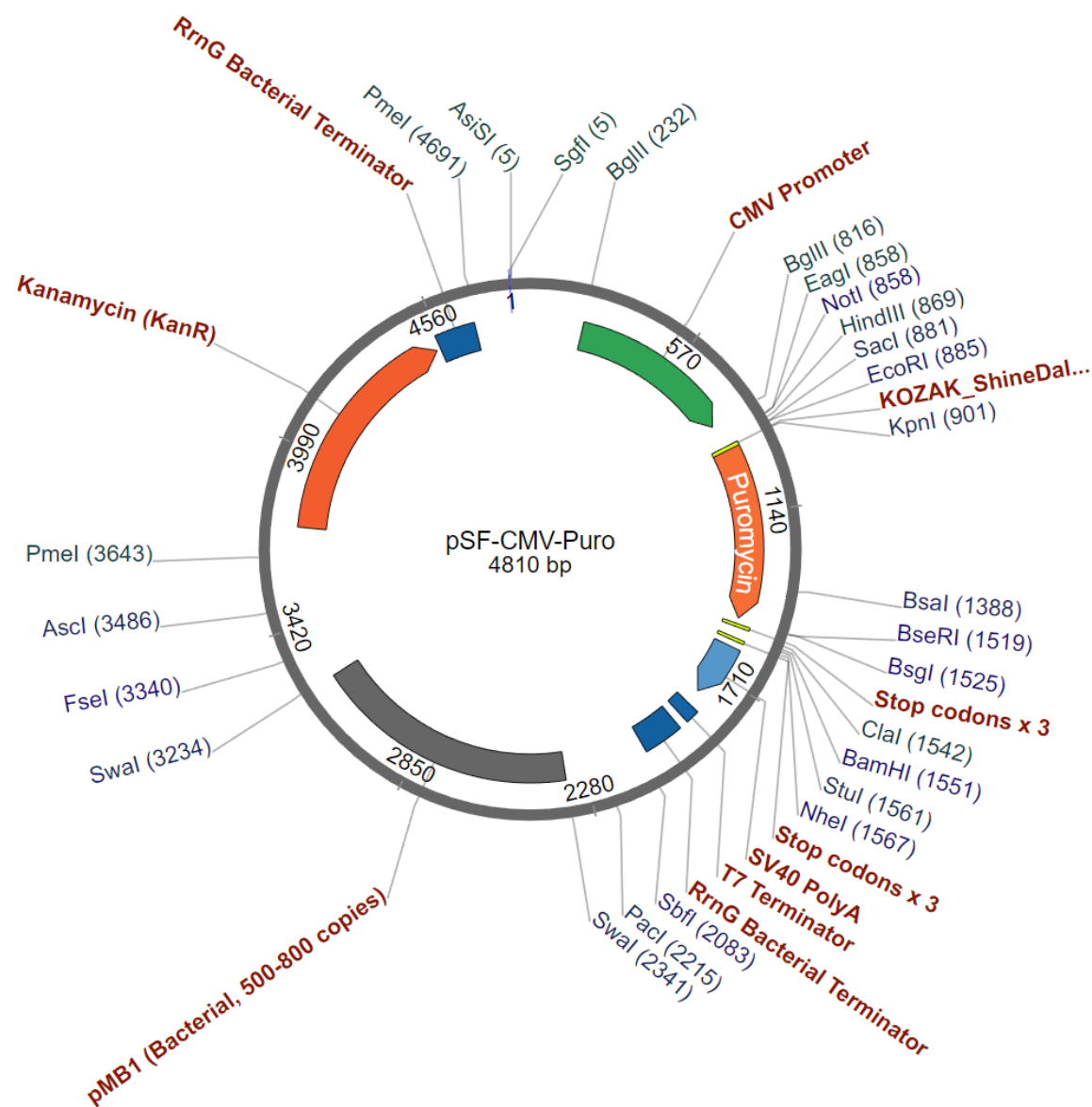
Lisa 1.2 pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9

Created with SnapGene®

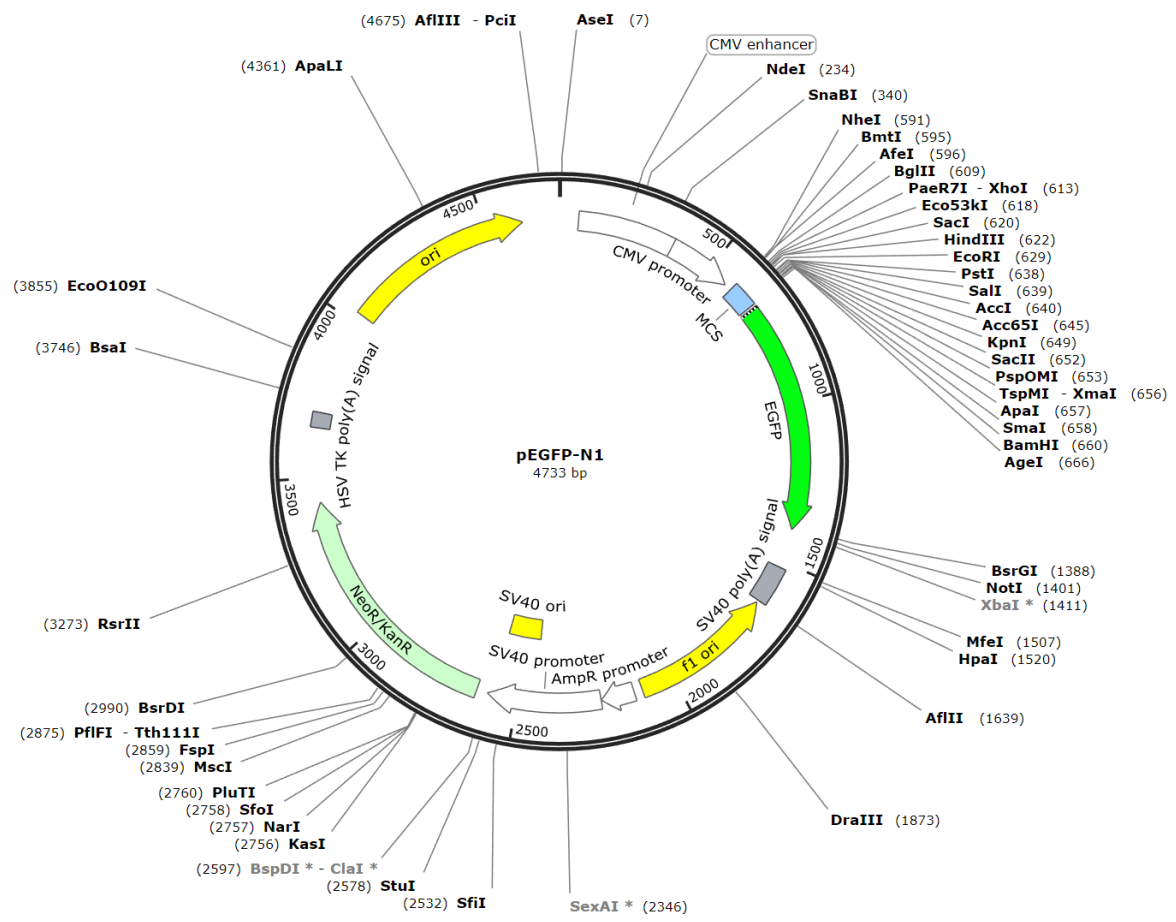




**Lisa 1.3** pSF-CMV-Puro CMV Driven Puromycin Selection Plasmid



**Lisa 1.4** pEGFP-N1 plasmiid



**Lisa 2.** gRNA järjestused (Tabel 3).

**Tabel 3.** Töös uuritud geenid ning neile vastavad gRNA järjestused.

Geen	gRNA järjestus
<i>DNAPK</i>	gRNA 1: GCAGGAGACCTTGTCCGCTG gRNA 2: GTGTGCGTTGCTCCCTGCTG
<i>Ku70</i>	gRNA 1: GCCCGCTTACCTTTGGCGCA gRNA 2: GCGAGACCGACCGAGCGAAG
<i>Ku80</i>	gRNA 1: GCGCCTGAGGACCGGCAACA gRNA 2: GAAGCGAGTTGCGACACGGC
<i>KAP1</i>	gRNA 1: GCGCGTGGTGCGGGTTTCGG gRNA 2: GTGCTTGTGCTTGTGGCGCG
<i>PARP1</i>	gRNA 1: GGCAGCGTGTTTCTAGGTCG gRNA 2: GCGCACGCGAGGCGGCGAGG

<i>TOP2A</i>	gRNA 1: GCTTCTCCACAGACGCGCGT gRNA 2: GATTGCAGGTACGGCTCGCGG
<i>TOP2B</i>	gRNA 1: GCGGTGTTATGCCGGACAAG gRNA 2: GCTCTGTTTATTGTCCCTCT
<i>RUVBL1</i>	gRNA 1: GCCGGGAGCTAAAACCAGCG gRNA 2: GTTACCATGCGGCCGTTACTA
<i>RUVBL2</i>	gRNA 1: GAGTCTCGAGTTTGAGAGAGG gRNA 2: GCATGGCAACCGTTGTAAGTG
<i>LMNB1</i>	gRNA 1: GCGCGGGAAAATGCAAGACGA gRNA 2: GTCCTCTCAGGCTGCACGGAG
<i>RANBP2</i>	gRNA 1: GTGACGCAGCGCCGTAGCCGG gRNA 2: GGACCACTGTGACGAACTTG
<i>BRD4</i>	gRNA 1: GTTCTGGTCTCCCGCAGCCG gRNA 2: GCGGTGACGTCAGTGCGCTGG

**Lisa 3.** qPCR'i ekspressioonipraimerid (Tabel 4)

**Tabel 4.** Töös kasutatud qPCR'i ekspressioonipraimerid

Geen	Praimerite järjestused
<i>S100A8</i>	F: GTCTTTCAGAAGACCTGGTG R: CGGTCTCTAGCAATTTCTTCAG
<i>KRT73</i>	F: GAGTGCAGGATGTCCGGAGAATA R: TTGCTGAATCCAAAGCCAGCC
<i>CEACAM5</i>	F: CCTGGATGTCCTCTATGGGC R: TACTGCGGGGATGGGTTAGA
<i>HPRT</i>	F: GCAGGTATCTGGTACTTGTGTTGG R: GCCAGCTTGATGGTCTACATTAC
<i>PSMD4</i>	F: ACTTGGTCAACTACCCCCTTCT R: CTTACAACAGGCCAGGAGTTTC
<i>dCas9</i>	F: CCACCATAGACAGAAAGCGGT R: TCCGAGACTGACGAGGTTCT
<i>DNAPK</i>	F: CATGACCTCCAGTGATCCCA

	R:CGAAGGCCCGCTTTAAGAGA
<i>Ku70</i>	F: TGACAGCTTTGAGAACCCCG R: CTTGGGCAATGTCAGGTCCA
<i>Ku80</i>	F: GCAGTGTCACCTCTGTTGGA R: GCTCGGATGCAGTCTATGCT
<i>TOP2A</i>	F: CGGAGAGCAGCAACAAAAACA R: GACACGACACTTTTCTGTGGT
<i>TOP2B</i>	F: AGCTGCTAAAAAGGGAAAACCG R: ATCCGAGTCAGAGTTTACAGCC
<i>RUVBL1</i>	F: TGAGTGCTTCACCTACCTGC R: CCTCAGTGCCTCTGATGACA
<i>RUVBL2</i>	F: CGGAAACGCAAGGGTACAGA R: TCGTTGAAGAGGAAGGCGTC
<i>BRD4</i>	F: CGCCCAAAAAGGACCTGAAA R: GAAGCTGTGCTGGATGACT
<i>PARP1</i>	F: TGGTCTCCAAGAGTGCCAAC R: CCCAAACCTTTGACACTGTGC
<i>KAP1</i>	F: GGATGTACCAGGGGAGGAGT R: TACACGCTCACATTTCCGCT
<i>RANBP2</i>	F: CAGAGACAAGCAAGGCTCCA R: CCTGTTCCACCTGACTTCC
<i>LMNB1</i>	F: TGTGCTGTAATCGAGCTCCC R: CAGCTCCTCCTTCTCCTGGA

**Lisa 4.** PCR'i amplifikatsioonipraimerid (Tabel 5) ning programm (Tabel 6).

**Tabel 5. PCR'i amplifikatsioonipraimerid**

Praimer	Praimeri järjestus
EGFP-F	AAAACCGGTATGGTGAGCAAGGGC
EGFP-R	AAAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
eGFP F	GCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGC
R1 (pcDNA3.1 BGH)	GGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGC

**Tabel 6. PCR reaktsiooni programm**

1.	2.	3.	4.	5.
I DNA ahelate denaturatsioon	II DNA ahelate denaturatsioon	Praimerite seondumine	DNA süntees	Lõpetav DNA süntees
15 min 95°C	30 s 95°C	30 s 55°C	30 s 72°C	5 min 72°C

2.-4. osa korrati 25 korda.

## **Lihtlitsents**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Hanna Sein

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

### **dCas9-KRAB liitvalgu mõju AIRE partnervalkude ekspressioonile**

mille juhendajad on Mario Saare ja Pärt Peterson

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Hanna Sein*

**30.05.2019**